

UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON cAMP-  
ANALOGA  
AUF HCN-SCHRITTMACHERKANÄLE

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Tim Leypold  
geboren am 08.12.1994 in Rudolstadt**

## **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. Klaus Benndorf, Jena**
- 2. Prof. Dr. Ralf Mrowka, Jena**
- 3. Prof. Dr. Stefan Gründer, Aachen**

**Datum des Staatsexamens: 09./10.12.2019**

**Datum der Disputation: 03.09.2019**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) .....</b>	<b>10</b>
1.1.1 Physiologische Bedeutung als <i>Second Messenger</i> .....	10
1.1.2 Chemische Struktur und mögliche Modifikationen .....	12
<b>1.2 HCN-Kanäle .....</b>	<b>17</b>
1.2.1 Physiologische Bedeutung .....	17
1.2.2 Struktur .....	19
1.2.3 Schaltverhalten .....	22
<b>2 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>3 Methodik .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 RNA-Herstellung .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Oozytenpräparation .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Patch-Clamp-Messungen .....</b>	<b>27</b>
3.3.1 Patch-Clamp-Messstand .....	27
3.3.2 Patch-Clamp-Messung .....	28
3.3.3 Messprotokoll .....	30
<b>3.4 Datenanalyse .....</b>	<b>30</b>
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
4.1 Wirkung des physiologischen Liganden cAMP auf den HCN2-Kanal .....	32
4.2 Wirkung der getesteten cAMP-Analoga auf den HCN2-Kanal .....	33
4.3 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der getesteten cAMP-Analoga .....	35
4.4 Effizienz der getesteten cAMP-Analoga im Vergleich zu cAMP .....	37
4.5 Konzentrationsabhängige Aktivierungskinetik der getesteten Analoga .....	38
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>39</b>
5.1 cAMP-Wirkung auf den HCN2-Kanal .....	39
5.2 Wirkung der cAMP-Analoga auf den HCN2-Kanal .....	40
5.2.1 Auswahl der Analoga .....	40

5.2.2 Potenz der Analoga .....	42
5.2.3 Effizienz und Aktivierungskinetik der Analoga .....	46
5.2.4 Selektivität der Analoga .....	47
<b>6 Schlussfolgerungen .....</b>	<b>51</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>52</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>58</b>
8.1 Lebenslauf .....	58
8.2 Ehrenwörtliche Erklärung .....	58
8.3 Danksagung .....	60

# Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AMP	Adenosinmonophosphat
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
c	Konzentration
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CNBD	<i>Cyclic Nucleotide-Binding Domain</i>
CNG	<i>Cyclic Nucleotide-Gated</i>
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
Cys	Cystein
eag	<i>ether-a-go-go</i>
$EC_{50}$	Konzentration bei halbmaximalem Effekt
Epac	<i>Exchange Protein directly activated by cAMP</i>
g	Gramm
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
GYG	Glycin-Tyrosin-Glycin
H	Hill-Koeffizient
HCN	<i>Hyperpolarization-Activated and Cyclic Nucleotide-Modulated</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hz	Hertz
I	Stromstärke
$I_{max}$	maximaler Strom bei sättigender Spannung
l	Liter
M	Molar
mHCN2	HCN2 der Maus
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PTFE	Polytetrafluorethyl
s	Sekunde
s.	siehe
$t_{1/2}$	halbmaximale Aktivierungszeit
Thr	Threonin
TM	Transmembrandomäne
V	Spannung
$V_{1/2}$	halbmaximale Spannung
vgl.	vergleiche
Å	Ångström
Ω	Ohm

# Zusammenfassung

Zyklische Nukleotide spielen im gesamten Körper als *Second Messenger* eine wichtige Rolle. Ihre Wirkung entfalten sie über die von ihnen aktivierten bzw. modulierten Proteine: die Proteinkinase A (PKA), das *Exchange Protein directly activated by cAMP* (Epac), die CNG- (*Cyclic Nucleotide-Gated*) Kanäle und die durch zyklische Nukleotide modulierten HCN- (*Hyperpolarization-Activated and Cyclic Nucleotide-Modulated*) Kanäle. Dysfunktionen dieser Zielproteine sind mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert, was sie zu attraktiven pharmakotherapeutischen Zielen macht. Da cAMP in der Lage ist, alle diese Proteine zu aktivieren, ist es von großem Interesse, proteinselektive cAMP-Analoga zu finden, um spezifische Beeinflussungen einzelner Systeme zu erreichen.

In dieser Arbeit wurden die fünf cAMP-Analoga 2-Cl-cAMP, 8-Cl-cAMP, N6-Phe-cAMP, N6-Bn-cAMP und N6-Bnz-cAMP in ihrer Wirkung auf den HCN2-Kanal untersucht. Für diese cAMP-Derivate wurde bisher eine Selektivität für die Proteinkinase A angenommen, ihr Effekt auf die HCN-Kanäle wurde allerdings noch nicht erforscht. Es wurde mittels Patch-Clamp-Technik an *Inside-out*-Makropatches gemessen, wie sich der Strom durch den Kanal bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen verhält. Durchgeführt wurden die Messungen an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* nach Injektion von mHCN2-RNA.

Überraschenderweise führten alle getesteten cAMP-Analoga zu einer Aktivierung des HCN2-Kanals. Die  $EC_{50}$ -Werte und damit die Potenzen der verschiedenen Liganden unterschieden sich. Von 8-Cl-cAMP, N6-Phe-cAMP und N6-Bn-cAMP waren im Vergleich zu cAMP niedrigere Konzentrationen notwendig, um eine halbmaximale Aktivierung zu erreichen. Die niedrigsten  $EC_{50}$ -Werte wurden für N6-Phe-cAMP gefolgt von N6-Bn-cAMP und 8-Cl-cAMP bestimmt. Der  $EC_{50}$ -Wert von 2-Cl-cAMP unterschied sich nur marginal von der Konzentration bei halbmaximalem Effekt von cAMP. N6-Bnz-cAMP hatte einen deutlich höheren  $EC_{50}$ -Wert als cAMP und war somit weniger potent. Hinsichtlich Effizienz und Aktivierungskinetik gab es zwischen den Derivaten jedoch keine wesentlichen Unterschiede. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, inwieweit es sich bei diesen Substanzen um PKA-selektive Agonisten handelt.

In der vorliegenden Arbeit wird durch einen Vergleich zwischen den ermittelten Potenzen für den HCN-Kanal und PKA-bezogenen Potenzen aus der Literatur diskutiert, ob durch geschickte Wahl des verwendeten Konzentrationsbereiches eine Selektivität erzielt werden kann. Auch auf chemische Modifikationen, welche möglicherweise zu einer Verbesserung der Selektivität der Liganden führen, wird eingegangen.



# 1 Einleitung

Alle lebenden Zellen sind durch eine Zellmembran von ihrer Umgebung abgetrennt. Es handelt sich dabei um eine Lipiddoppelschicht, in die Proteine ein- bzw. angelagert sind. Ionenkanäle, zu denen auch die HCN- (*Hyperpolarization-Activated and Cyclic Nucleotide-Modulated*) Kanäle gehören, sind spezielle Membranproteine, die geladenen Ionen die Passage durch diese Lipiddoppelschicht erlauben. Unterscheiden kann man Ionenkanäle anhand der permeierenden Ionen. Handelt es sich um positive Ionen wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{K}^+$ , spricht man von Kationenkanälen, bei negativ geladenen Ionen wie  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{NO}_3^-$ , von Anionenkanälen. Weiterhin werden sie anhand des zur Aktivierung führenden Stimulus unterschieden. Zu diesen Stimuli zählen Ligandenbindung, Membranspannung, Temperatur, Osmolarität und mechanische Kräfte. Durch Depolarisation oder Hyperpolarisation der Membranspannung werden spannungsgesteuerte Kanäle aktiviert oder deaktiviert. Als Depolarisation wird dabei die Änderung der Spannung zu positiveren, als Hyperpolarisation zu negativeren Werten bezeichnet. Ändern Ionenkanäle ihren Aktivierungszustand durch Bindung von extrazellulären oder intrazellulären Botenstoffen, spricht man von ligandengesteuerten Ionenkanälen. Der für HCN-Kanäle bedeutsamste Ligand ist das zyklische Adenosinmonophosphat, kurz cAMP.

## 1.1 Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

### 1.1.1 Physiologische Bedeutung als *Second Messenger*

Das zyklische Adenosinmonophosphat bewirkt als intrazellulärer Botenstoff die Regulation von Enzym- und Genaktivitäten. Bestimmte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktivieren über G-Proteine die membranständige Adenylatzyklase, welche zyklisches AMP aus ATP synthetisiert. Ein aktiviertes Adenylatzyklase-Enzym kann mehrere tausend cAMP-Moleküle bilden, wodurch das Signal effizient verstärkt wird. CAMP verteilt sich anschließend über die Zelle und aktiviert die Proteinkinase A (PKA), das *Exchange Protein directly activated by cAMP* (Epac), die CNG- (*Cyclic Nucleotide-Gated*) Kanäle oder beeinflusst die durch zyklische Nukleotide modulierten HCN-Kanäle. Das Enzym Phosphodiesterase wandelt letztendlich 3',5'-cAMP in 5'-AMP um, wodurch das Signal unterbrochen wird.

Neuere Arbeiten beschäftigen sich mit cAMP-Kompartimenten und wie diese entstehen. Heutzutage ist bekannt, dass sich cAMP-Moleküle nach ihrer Bildung nicht ungezielt im Zytoplasma verteilen, sondern in Mikrodomänen konzentriert werden und so gezielt am Effektorprotein wirken können. Eine wichtige Rolle für die Ausbildung der Mikrodomänen spielen die Phosphodiesterasen. CAMP akkumuliert in den Bereichen, welche frei von Phosphodiesterasen sind, wodurch cAMP-Hotspots entstehen. Auch das Vorhandensein von physikalischen Barrieren, durch welche cAMP nur schwer diffundieren kann und somit in die Hotspots gelenkt wird, steht in der Diskussion (McCormick und Baillie 2014, Filadi und Pozzan 2015).

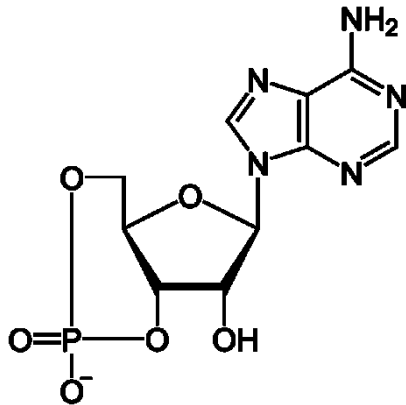
Die Wirkung der cAMP-abhängigen Proteinkinase ist sehr vielfältig und umfasst zum Beispiel die Hemmung der Glykogensynthese in der Leber und die Aktivierung der Glykogenolyse, die gesteigerte Salzsäureproduktion im Magen, die Öffnung von Cl<sup>-</sup>-Kanälen in Epithelzellen und die Modulation spannungsabhängiger Ionenkanäle in Nervenzellen. Außerdem bewirkt die Proteinkinase A die Expression verschiedener Gene, indem sie den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP Response Element-Binding Protein*) phosphoryliert (Löffler et al. 2006, Thiel et al. 2005, Habib et al. 2015).

Auch das 1998 entdeckte Epac spielt eine wichtige Rolle in verschiedensten Organen (de Rooij et al. 1998). Im Herzen reguliert es die Calciumhomöostase und somit die Kontraktion, Relaxation und Herzfrequenz. Eine Fehlfunktion von Epac wird mit Herzhypertrophie assoziiert. Im Gehirn hat es eine wichtige Funktion bei der Differenzierung und Regeneration von Nervenzellen, bei der Regulierung der Signalübertragung und bei Lernprozessen. Im Pankreas reguliert Epac die Insulinsekretion und wird bei Dysfunktion mit der Entstehung von Diabetes mellitus assoziiert. Im Gefäßsystem verstärkt es die endotheliale Barrierefunktion und kontrolliert den Gefäßtonus. Auch in der Lunge reguliert das Protein die epitheliale Barriere und den Tonus der glatten Muskulatur (Schmidt et al. 2013).

Die CNG-Kanäle befinden sich in zahlreichen sensorischen Zellen wie in den Stäbchen und Zapfen der Retina, den olfaktorischen Zilien, den Haarzellen der Cochlea und den Geschmacksknospen und sind dort an der Signaltransduktion beteiligt (Fesenko et al. 1985, Cobbs et al. 1985, Nakamura und Gold 1987, Kolesnikov et al. 1991, Misaka et al. 1997). Zusätzlich lassen sie sich auch in nicht sensorischen Zellen nachweisen, unter anderem in der Niere, der Aorta, dem Hoden, der Lunge, den Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäße und dem Darm (Biel et al. 1993, Biel et al. 1994, Weyand et al. 1994, Xu et al. 1999, Yao et al. 1999, Qiu et al. 2000). Im zentralen Nervensystem sind die CNG-Kanäle in die neuronale Entwicklung und Plastizität involviert (Wei et al. 1998).

### 1.1.2 Chemische Struktur und mögliche Modifikationen

#### cAMP

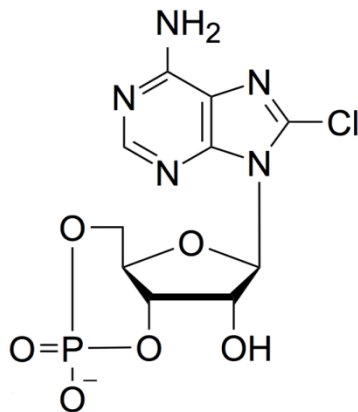


CAMP ist ein zyklisches Nukleotid, bestehend aus einem Adenin (Nukleotidbase) und einer Ribose (Zuckerrest) mit zyklischer Phosphodiestergruppierung am Riboserest. Das zyklische Adenosinmonophosphat wird aus Adenosintriphosphat durch Abspaltung der zwei endständigen Phosphatgruppen an der Ribose und Ringschluss zwischen der verbleibenden Phosphatgruppe mit der Hydroxygruppe am C3'-Atom gebildet. Das Phosphat ist im cAMP somit mit der 5'- und der 3'-Hydroxygruppe verestert. Das Molekulargewicht beträgt 351,2 g/mol.

Es gibt hunderte verschiedene cAMP-Analoga, da für zahlreiche Studien zu Struktur-Funktions-Beziehungen bei cAMP-bindenden Proteinen, auf der Suche nach selektiven Agonisten und Antagonisten und zur Überprüfung potentieller therapeutischer Effekte verschiedenste Derivate entwickelt wurden. Modifiziert wird am N1-, C2-, N3-, C6-, N7- und C8-Atom des Adenins, am C2'- und C3'-Atom der Ribose und an der zyklischen Phosphodiestergruppe. Die häufigsten Modifikationen findet man am C8-Atom, gefolgt von C2'- und C2-Atom (BIOLOG LSI Bremen 2018).

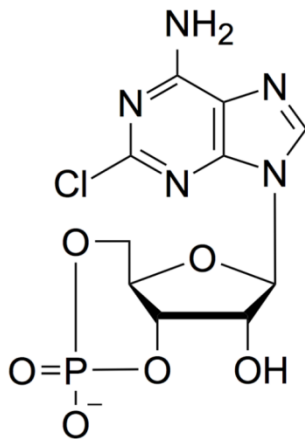
Die im Folgenden aufgelisteten cAMP-Derivate wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihre Wirksamkeit am HCN2-Kanal untersucht.

## 8-Cl-cAMP



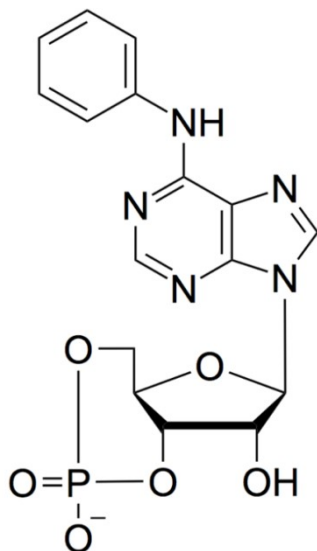
8-Cl-cAMP ist ein cAMP-Analogon, bei dem das Wasserstoffatom am C8-Atom der Nukleinbase durch ein Chloratom ersetzt wurde. Das Molekulargewicht beträgt 385,6 g/mol. 8-Cl-cAMP ist ein potenter Stimulator der cAMP-abhängigen Proteinkinasen. Es hat eine hohe Affinität für die Bindungsstellen A und B der Proteinkinase A Typ I (Cho-Chung 1990) und für die Bindungsstelle B der Proteinkinase A Typ II (Ally et al. 1988). Die Phosphodiesterase baut 8-Cl-cAMP langsamer ab als cAMP. 8-Cl-cAMP hat eine stärkere Lipophilie als cAMP und kann somit Biomembranen gut durchdringen. Bereits in einer geringen Konzentration stoppt es das Wachstum verschiedener Krebstypen, weshalb ein potentieller therapeutischer Einsatz geprüft wird (Lange-Carter et al. 1993, Weissinger et al. 2004, Guillemin et al. 2002, Cho-Chung und Clair 1993, Katsaros et al. 1987, Moll et al. 2006, Jager et al. 2012, Dicitore et al. 2016, Grassi et al. 2017, Rohlf et al. 1993, BIOLOG LSI Bremen 2018). Eine Wirkung auf den HCN-Kanal wurde noch nicht beschrieben.

## 2-Cl-cAMP



2-Cl-cAMP ist ein cAMP-Analogon, bei dem das Wasserstoffatom am C2-Atom des Adenins durch ein Chloratom ersetzt wurde. Das Molekulargewicht beträgt 385,6 g/mol. Es ist ein selektiver Stimulator mit hoher Affinität für die Bindungsstelle B von Proteinkinase A Typ I und Typ II (Jager et al. 2012, Scott et al. 2007, Moll et al. 2006, OGREID et al. 1989, BIOLOG LSI Bremen 2018). Eine Wirkung auf den HCN-Kanal wurde noch nicht beschrieben.

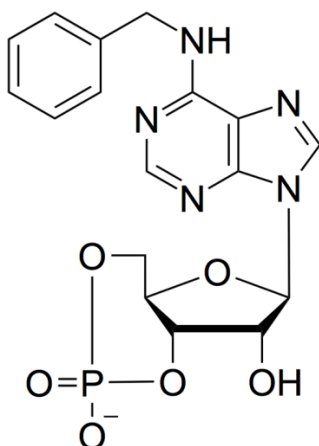
## N6-Phe-cAMP



N6-Phe-cAMP ist ein cAMP-Analogon, bei dem ein Wasserstoffatom der Aminogruppe bei Position 6 des Adenins durch einen Phenyl-Ring ersetzt wurde.

Das Molekulargewicht beträgt 427,3 g/mol. N6-Phe-cAMP ist einer der stärksten Aktivatoren von cAMP-abhängigen Proteinkinasen, welcher aber nicht Epac aktiviert. N6-Phe-cAMP hat eine starke Selektivität zwischen cAMP- und cGMP-Proteinkinasen. Das cAMP-Analogon zeigt eine hohe metabolische Stabilität gegenüber der Phosphodiesterase und ist ein nahezu selektiver Stimulator der Bindungsstelle A von Proteinkinase A Typ I und Typ II. N6-Phe-cAMP wird als geeignete Wahl für eine synergistische Aktivierung von Proteinkinase Typ I oder Typ II im Zusammenspiel mit anderen cAMP-Analoga beschrieben. Es ist sehr lipophil und hat dadurch eine gute Membranpermeabilität, während es in wässrigen Lösungsmitteln gelöst bleibt (Jager et al. 2012, Moll et al. 2006, Ogreid et al. 1989, Rehmann et al. 2003, BIOLOG LSI Bremen 2018). Eine Wirkung auf den HCN-Kanal wurde noch nicht beschrieben.

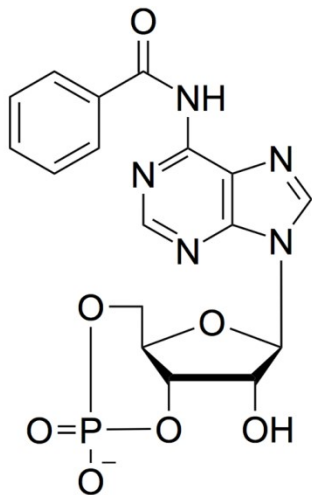
### N6-Bn-cAMP



N6-Bn-cAMP ist ein cAMP-Analogon, bei welchem ein Wasserstoffatom der Aminogruppe bei Position 6 des Adenins durch einen Benzyl-Rest ersetzt wurde. Das Molekulargewicht beträgt 441,3 g/mol. Es ist ein Stimulator der cAMP-abhängigen Kinasen mit gewisser Selektivität für die Bindungsstelle A dieser Proteine. Häufig wird es in Kombination mit 8-Cl-cAMP verwendet, um die Proteinkinase synergistisch zu aktivieren. Wie auch N6-Phe-cAMP aktiviert es Epac nicht. Bereits in einer geringen Konzentration stoppt N6-Bn-cAMP das Wachstum verschiedener Krebstypen, weshalb auch hier ein potentieller therapeutischer Einsatz geprüft wird. Im Vergleich zu cAMP hat dieses Analogon eine erhöhte Stabilität gegenüber Esterasen, einschließlich der Phosphodiesterasen, sowie Amidasen und

durch seine stärkere Lipophilie besitzt es eine höhere Membranpermeabilität (Jager et al. 2012, Cho-Chung und Clair 1993, Katsaros et al. 1987, Tagliaferri et al. 1988, BIOLOG LSI Bremen 2018). Eine Wirkung auf den HCN-Kanal wurde noch nicht beschrieben.

### N6-Bnz-cAMP



N6-Bnz-cAMP ist ein cAMP-Analogon, bei welchem ein Wasserstoffatom der Aminogruppe bei Position 6 des Adenins durch eine Benzoylgruppe ersetzt wurde. Das Molekulargewicht beträgt 455,3 g/mol. Es ist ein Aktivator der Proteinkinase A, aber nur schwacher Epac Agonist. Die einzigartige Selektivität für die Bindungsstelle A von Proteinkinase A I und II macht N6-Bnz-cAMP zu einem passenden Partner für eine synergistische Aktivierung mit cAMP-Analoga, welche selektiv für Bindungsstelle B sind. Das cAMP-Analogon zeigt eine erhöhte metabolische Stabilität gegenüber der Phosphodiesterase. Es ist sehr lipophil und hat dadurch eine gute Membranpermeabilität, während es in wässrigen Lösungsmitteln gelöst bleibt (Jager et al. 2012, Bos 2006, BIOLOG LSI Bremen 2018). Eine Wirkung auf den HCN-Kanal wurde noch nicht beschrieben.



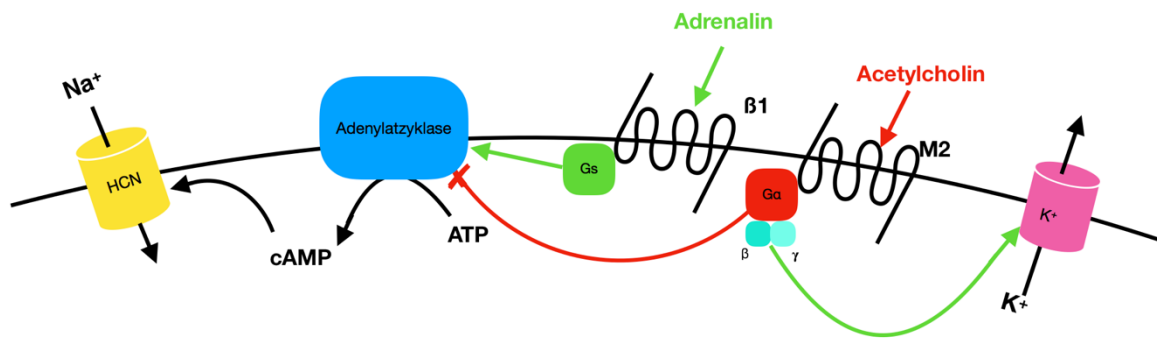
## 1.2 HCN-Kanäle

### 1.2.1 Physiologische Bedeutung

In elektrisch automatischen Zellen tragen HCN-Kanäle durch Aktivierung und Deaktivierung zur Generierung eines Rhythmus bei. Der von ihnen erzeugte Strom wird deshalb auch als Schrittmacherstrom bezeichnet. Dieser Schrittmacherstrom wurde erstmals am Herzen beschrieben (Brown et al. 1979). Wenig später entdeckte man ihn auch in Nervenzellen (Mayer und Westbrook 1983).

Heute ist bekannt, dass HCN-Kanäle in den Zellen des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems des Herzens für die Schrittmacherdepolarisation verantwortlich sind und somit die Aktionspotentialfrequenz bestimmen. Weitere Funktionen der Kanäle im Herzen, wie die Erregungsweiterleitung, die Kontrolle und Aufrechterhaltung der sinoatrialen Netzwerkaktivität und die Stabilisierung des Herzrhythmus, werden diskutiert (Wahl-Schott et al. 2014, Sartiani et al. 2015, Morad und Zhang 2017).

HCN-Kanäle werden unter anderem durch Sympathikus und Parasympathikus reguliert (Abbildung 1). Der Sympathikus bewirkt mit Adrenalin über  $\beta_1$ -Rezeptoren die Aktivierung eines aktivierenden G-Proteins, welches die Adenylatzyklase stimuliert. Diese bildet cAMP aus ATP, welches HCN-Kanäle stimuliert, sodass  $\text{Na}^+$ -Einstrom und Depolarisationsrate ansteigen und das Schwellenpotential schneller erreicht wird. Der Sympathikus bewirkt somit eine Herzfrequenzsteigerung (positiv chronotrope Wirkung). Der Parasympathikus wirkt über einen gegensätzlichen Mechanismus. Acetylcholin aktiviert muskarinerge M2-Rezeptoren, welche mit G-Proteinen gekoppelt sind, deren  $\alpha$ -Untereinheiten inhibitorisch auf die Adenylatzyklase wirken und deren  $\beta\gamma$ -Untereinheiten einen Acetylcholin-stimulierbaren  $\text{K}^+$ -Kanal aktivieren. Die sinkende cAMP-Konzentration führt zu einem reduzierten Strom durch die HCN-Kanäle und der erhöhte  $\text{K}^+$ -Ausstrom wirkt zusätzlich der Depolarisation durch den  $\text{Na}^+$ -Einstrom entgegen. Der Parasympathikus bewirkt somit eine Senkung der Herzfrequenz (negativ chronotrope Wirkung). Unter Ruhe steht der Schrittmacher des Herzens unter dem hemmenden Einfluss des *Nervus vagus* (Parasympathikus).



### Abbildung 1: Wirkung von Sympathikus und Parasympathikus auf den HCN-Kanal

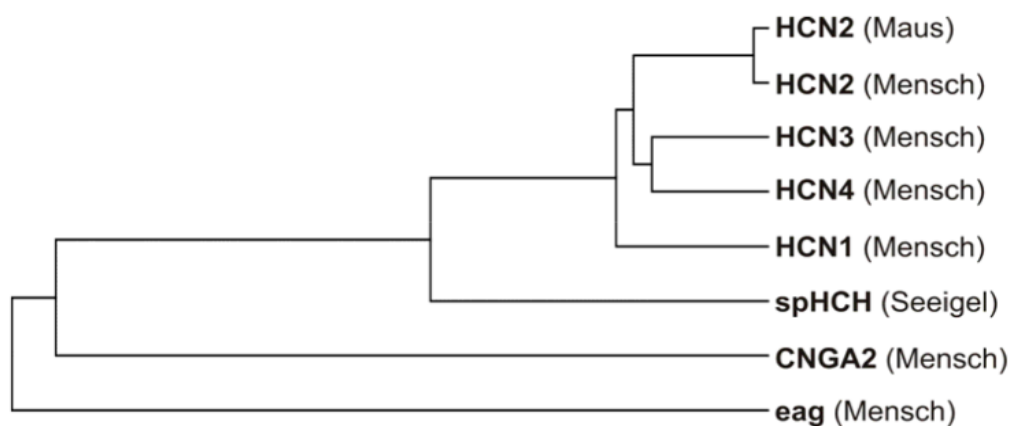
In dieser schematischen Zeichnung ist der Einfluss des vegetativen Nervensystems auf den HCN-Kanal dargestellt. Der Sympathikus bewirkt über Adrenalin und ein aktivierendes G-Protein ( $G_s$ ) eine Aktivierung (grüner Pfeil), der Parasympathikus über Acetylcholin und ein hemmendes G-Protein ( $G_q$ ) eine Hemmung (roter Strich) der Adenylatzyklase. Ist die Adenylatzyklase aktiviert, bildet sie cAMP aus ATP. cAMP wiederum stimuliert den HCN-Kanal. Zusätzlich aktiviert die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins des M2-Rezeptors einen  $\text{K}^+$ -Kanal. Der dadurch hervorgerufene erhöhte  $\text{K}^+$ -Ausstrom wirkt dem  $\text{Na}^+$ -Einstrom und damit einer Depolarisation der Zelle entgegen.

Im Nervensystem sind die dort weit verbreiteten HCN-Kanäle an der Erregbarkeit der Nervenzellen, der synaptischen Erregungsübertragung und der Netzwerkaktivität beteiligt. Die HCN-Kanäle spielen eine wichtige Rolle bei der neuronalen Plastizität und für das Gedächtnis. Außerdem sind sie relevant bei der Entstehung der thalamokortikalen Oszillationen und bei der Funktion des somatosensorischen Systems (Benarroch 2013).

Aufgrund ihrer zahlreichen Funktionen sind Fehlfunktionen der HCN-Kanäle ursächlich für verschiedenste Erkrankungen wie Arrhythmie, ventrikuläre Hypertrophie und Herzinsuffizienz, Epilepsie, neuropathischer Schmerz, Autismus-Spektrum-Störung, Schizophrenie, Substanzmissbrauch und Sucht, depressive Störung, Angststörung, Schmerzen und neurodegenerative Erkrankungen (DiFrancesco und DiFrancesco 2015, Verkerk und Wilders 2015, Sartiani et al. 2017). Dies macht HCN-Kanäle zu attraktiven Zielen in der Erforschung neuer Therapieansätze (Tibbs et al. 2016, Postea und Biel 2011, Sartiani et al. 2017).

### 1.2.2 Struktur

HCN-Kanäle und die strukturverwandten CNG-Kanäle zählen zur Gruppe der Zyklonukleotid-modulierten Kationenkanäle, welche der Familie der Porenschleifen-Kationenkanäle angehören. Zusätzlich können sie durch ihre Funktion und Struktur den spannungsaktivierten  $K^+$ -Kanälen zugeordnet werden (Biel et al. 2009) (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der HCN-Kanäle**

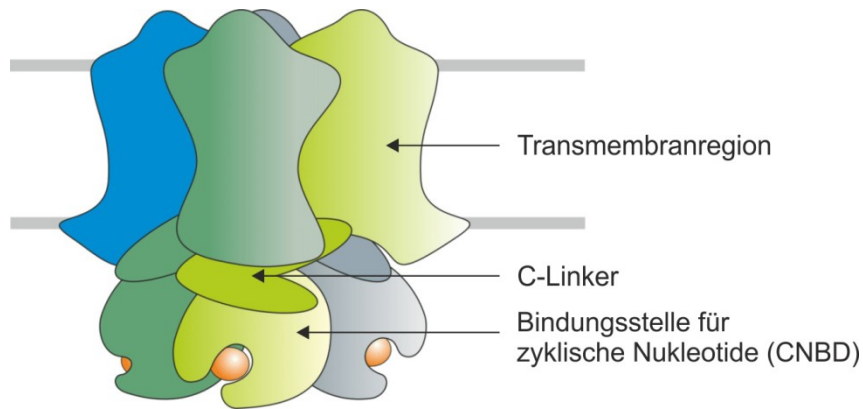
Am Beispiel der CNG-Kanäle (CNGA2-Untereinheit) und der eag- (*ether-a-go-go*)  $K^+$ -Kanäle sind in diesem Stammbaum die Verwandtschaft der HCN-Isoformen und ihre Verwandtschaft zu anderen Kationenkanälen dargestellt. Der Stammbaum wurde anhand der Sequenzhomologien der Aminosäuresequenzen erstellt. Modifiziert nach (Thon 2012).

Der HCN-Kanal ist ca. 100 Å hoch (senkrecht zur Zellmembran) und ca. 75 Å breit (innerhalb der Zellmembran) (Lee und MacKinnon 2017).

HCN-Kanäle sind aus vier Untereinheiten zusammengesetzt, welche eine zentrale Pore bilden (Abbildung 3). Jede Untereinheit besitzt sechs transmembranäre Segmente S1 bis S6 und ist damit nach einer 6TM-Architektur (TM = Transmembrandomäne) aufgebaut (Yellen 2002) (Abbildung 4). Die S5- und S6-Segmente aller vier Untereinheiten bilden gemeinsam die ionenleitende Pore. Sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Region liegen intrazellulär. Die Bindungsstelle für zyklische Nukleotide (CNBD, *Cyclic Nucleotide-Binding Domain*) befindet sich in der C-terminalen Region. Die CNBD ist durch den C-Linker mit dem

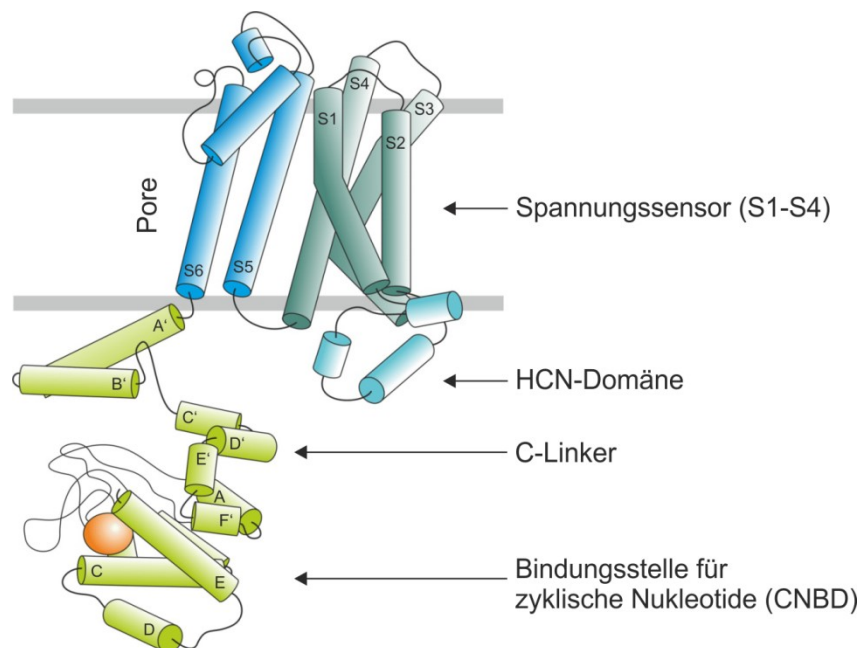
S6-Segment verbunden. Die vier C-Linker bilden gemeinsam die C-Linker-Scheibe. Jede CNBD kann einen Liganden binden, sodass jeder HCN-Kanal durch die Bindung von maximal vier Liganden moduliert werden kann (Yellen 2002).

Die Aminosäuren zwischen den porenbildenden Segmenten S5 und S6 bilden eine Porenschleife (Yu et al. 2005). Diese ragt von extrazellulär in die Kanalpore hinein und enthält, wie auch bei  $K^+$ -selektiven Kanälen, den Selektivitätsfilter mit der Aminosäuresequenz Glycin-Tyrosin-Glycin (Doyle et al. 1998). HCN-Kanäle leiten unter physiologischen Bedingungen allerdings hauptsächlich  $Na^+$ -Ionen, obwohl sie eine höhere Leitfähigkeit für  $K^+$ -Ionen besitzen (DiFrancesco 1981, Wollmuth und Hille 1992, Lee und MacKinnon 2017). Das Segment S4 ist durch neun basische Reste an jeder dritten Aminosäureposition positiv geladen und stellt damit den Spannungssensor dar (Chen et al. 2000). Die Segmente S1 bis S3 bestimmen die Aufgabe des Spannungssensors wesentlich mit (Ishii et al. 2007). Die außergewöhnliche Länge der S4-Helix im Vergleich zu depolarisationsabhängigen Ionenkanälen wird unter anderem als Grund dafür gesehen, dass die Pore des HCN-Kanals bei Membrandepolarisation im geschlossenen Zustand vorliegt (Lee und MacKinnon 2017). Ein  $\alpha$ -helikaler S4-S5-Linker bewirkt wie ein mechanischer Hebel, dass eine Konformationsänderung des Spannungssensors die Kanalpore öffnet oder schließt. Die 45 Aminosäuren, die sich N-terminal des S1-Segments befinden, formen eine 3- $\alpha$ -helikale Domäne, welche zwischen dem Spannungssensor und den zytoplasmatischen Domänen liegt. Da diese Domäne nur bei HCN-Kanälen vorkommt, wird sie HCN-Domäne genannt. Die HCN-Domänen wirken wahrscheinlich wie Zangen, welche den Kanal auf Höhe der C-Linker-Scheibe verengen können (Lee und MacKinnon 2017).



### Abbildung 3: Schematische Darstellung des HCN-Kanals

Der Kanal besteht aus vier Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten besteht aus einer transmembranären Region, welche über den C-Linker mit der intrazellulär liegenden Bindungsstelle für zyklische Nukleotide verbunden ist. Die vier C-Linker bilden gemeinsam die C-Linker-Scheibe (Zagotta et al. 2003, Lee und MacKinnon 2017) (Abbildung zur Verfügung gestellt von J. Kusch).



### Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur einer HCN-Untereinheit

Eine Untereinheit besteht aus sechs transmembranären Segmenten (S1-S6), von denen S4 als Spannungssensor dient. S5 und S6 aller vier Untereinheiten bilden gemeinsam die ionenleitende Pore mit dem GYG-Selektivitätsfilter. N-terminale und C-terminale Region liegen intrazellulär. Die C-terminale Region besteht aus C-Linker ( $\alpha$ -Helices A'-F') und CNBD ( $\alpha$ -Helices A, P, B, C, D, E). Die 3- $\alpha$ -helikale N-terminale Region bildet die HCN-Domäne (Yellen 2002, Lee und MacKinnon 2017) (Abbildung zur Verfügung gestellt von J. Kusch).

Man unterscheidet vier HCN-Isoformen, HCN1 bis HCN4. Bei diesen sind die Aminosäuresequenzen der transmembranären Region und der CNBD mit einer Sequenzhomologie von 80-90% stark konserviert. Die Sequenzhomologie der zytosolischen N-terminalen Region und der Aminosäuresequenz distal der CNBD ist gering. Sie unterscheiden sich in Länge und Anordnung der Aminosäuren (Kaupp und Seifert 2001).

### 1.2.3 Schaltverhalten

HCN-Kanäle weisen ein duales Schaltverhalten, auch *Gating* genannt, auf. Sie werden durch Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert und durch zyklische Nukleotide moduliert.

Primärer Stimulus zur Kanalaktivierung ist eine hyperpolarisierende Spannung, welche eine Einwärtsbewegung des Spannungssensors S4 bewirkt. Dies löst die Öffnung der Kanalpore aus. Die Gleichgewichts-Aktivierungskurve der spannungsinduzierten Aktivierung ist sigmoid und kann durch eine Boltzmann-Funktion beschrieben werden (Edman et al. 1987). Die Kanäle aktivieren langsam und zeigen keine Inaktivierung bei anhaltender Hyperpolarisation. Erst nach mehreren hundert Millisekunden bis mehreren Sekunden erreicht die Stromamplitude makroskopischer Ströme ein Maximum. Eine Zunahme der hyperpolarisierenden Spannung beschleunigt die Aktivierung.

Durch die Bindung zyklischer Nukleotide an die intrazellulären Bindungsstellen kann die Kanalaktivierung gesteigert werden. Sowohl cAMP als auch cGMP können an die CNBD binden und einen ähnlich starken Effekt auf die Kanäle ausüben (Ludwig et al. 1998). Physiologisch relevanter ist die cAMP-Bindung, da cAMP in niedrigeren Konzentrationen zur Aktivierung führt. Die Aktivierungskurve des Kanals wird durch Bindung eines zyklischen Nukleotids in Richtung positiverer Spannungen verschoben, wodurch der Kanal bereits bei schwächerer Hyperpolarisation öffnet (DiFrancesco 1993). Bei gleicher Membranspannung entwickelt sich der Strom in Anwesenheit eines Liganden schneller und erreicht eine höhere Amplitude.

Hat die CNBD keinen Liganden gebunden, übt sie mit dem C-Linker gemeinsam eine basale Hemmung auf die Transmembranregion aus, Autoinhibition genannt. Diese Autoinhibition wird durch Bindung zyklischer Nukleotide aufgehoben (Wainger et al. 2001, Wang et al. 2001). Die Grundlagen diesbezüglich sind noch weitestgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass der C-Linker durch die Besetzung der CNBD mit einem zyklischen Nukleotid seine Konformation ändert und somit keine Hemmung mehr auf die Kanalöffnung ausüben kann. Ob der C-Linker nach Ligandenbindung in einer kompakten Form vorliegt (Akimoto et al. 2014) oder eine eher lockere Konformation einnimmt (Zagotta et al. 2003), ist noch nicht abschließend geklärt.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der vier HCN-Isoformen unterscheiden sich bezüglich ihrer Aktivierungsgeschwindigkeit, ihrer Spannungsabhängigkeit und des Ausmaßes der Modulation durch zyklische Nukleotide. Kanäle aus HCN1-Untereinheiten aktivieren am schnellsten, gefolgt von HCN2, HCN3 und HCN4. HCN2- und HCN4-Kanäle weisen eine starke Modulierbarkeit durch cAMP auf, HCN1-Kanäle sind hingegen nur schwach cAMP-abhängig. Bei den HCN2- und HCN4-Kanälen verschiebt sich nach cAMP-Bindung das benötigte Membranpotential um 10 bis 25 mV (Wahl-Schott und Biel 2009), bei den HCN1-Kanälen nur um 2 bis 6 mV (Wainger et al. 2001, Wang et al. 2001). HCN3-Kanäle werden bei cAMP-Bindung trotz des Vorliegens einer CNBD nicht aktiviert, sondern die Aktivierungskurve wird sogar in Richtung negativerer Spannungen verschoben (Mistik et al. 2005, Stieber et al. 2005). Erklärt wird dies durch die kürzere C-terminale Sequenz hinter der CNBD (Stieber et al. 2005).

## 2 Ziele der Arbeit

cAMP ist ein *Second Messenger*, welcher in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert ist. Drei Haupttypen von Proteinen vermitteln die von cAMP induzierte Wirkung. Es handelt sich dabei um die Proteinkinase A (PKA), das *Exchange Protein directly activated by cAMP* (Epac) und die durch zyklische Nukleotide aktivierten bzw. modulierten HCN- und CNG-Kanäle. Um zwischen den verschiedenen Signalwegen des cAMP's diskriminieren zu können, ist es nötig, nur einen Proteintyp zu aktivieren. Zu diesem Zweck nutzte man cAMP-Analoga mit Modifikationen am N6-Atom des Adeninrings für den PKA-Signalweg und an der 2'-Hydroxygruppe der Ribose für den Epac-Signalweg. Allerdings wurden die durch zyklische Nukleotide modulierten Kanäle in diesen Studien bisher weitestgehend außer Acht gelassen. Aufgrund der weiten Verbreitung dieser Kanäle in verschiedensten Organen sind potenzielle Kreuzreaktionen durch PKA- oder Epac-selektive Agonisten eine wichtige Fragestellung. Um eine Steigerung der Selektivität von cAMP-Analoga zu erreichen, ist außerdem von Interesse, welche chemische Veränderung den HCN2-Kanal wie beeinflusst. Durch die Kenntnis darüber sind Spekulationen über mögliche affinitätssteigernde Konzentrationsbereiche und Modifikationen möglich.

In dieser Arbeit wurde der Effekt von den fünf PKA-selektiven cAMP-Derivaten: 2-Cl-cAMP, 8-Cl-cAMP, N6-Phe-cAMP, N6-Bn-cAMP und N6-Bnz-cAMP auf den HCN2-Schrittmacherkanal untersucht.



## 3 Methodik

Zur Untersuchung des HCN2-Kanals unter dem Einfluss der verschiedenen Liganden wurde die Patch-Clamp-Technik an Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* angewendet. Mit dieser Messmethode ließ sich der Strom durch den Kanal messen.

### 3.1 RNA-Herstellung

Zur Expression des HCN2-Kanals wurden die Oozyten mit cRNA der Maus injiziert. Prof. Dr. Benjamin Kaupp (*Center of Advanced European Studies and Research*, Bonn) stellte die cDNA für mHCN2 (HCN2 der Maus) (NCBI *Reference Sequence*: NM\_008226.2) zur Verfügung. Die cDNA wurde in den Oozytenvektor pGemHEnew (Liman et al. 1992) integriert und im Wirt *Escherichia coli* vervielfältigt. Nach der Isolierung der Plasmid-DNA durch Lyse und Reinigung erfolgte die Linearisierung mit *Sa*I (mHCN2). Aus der DNA wurde *in vitro* mit dem Kit mMESSAGE mMACHINE (Ambion®, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) cRNA transkribiert. Nach Reinigung durch eine LiCl-Fällung und Lösung in RNase-freiem H<sub>2</sub>O wurde mittels NanoDrop die Konzentration der cRNA-Lösung bestimmt und auf eine Standardkonzentration von 100 ng/µl verdünnt. Diese molekularbiologischen Arbeiten wurden freundlicherweise von Frau Karin Schoknecht und Prof. Thomas Zimmer (Institut für Physiologie II, Jena) durchgeführt. Die cRNA wurde bei -80°C gelagert.

### 3.2 Oozytenpräparation

Die Oozyten wurden chirurgisch aus dem südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* entnommen. Dafür wurden die Frösche vor dem Eingriff mit 0,1% Tricainlösung (3-Aminobenzoesäure ethylester-methansulfonat = MS222 (Pharmaq, Fordingbridge, Grossbritannien)) narkotisiert. Der pH-Wert der MS222-Lösung wurde

durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat auf 7,1 eingestellt. Nach der Entnahme wurden die Oozyten für 105 Minuten in Kollagenase-Lösung ((3 mg/ml Kollagenase A (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) gelöst in OR2-Lösung (Tab. 1)) bei 20°C geschwenkt. Nach der anschließenden Entfernung der Follikelmembran mit Pinzetten erfolgte die Lagerung bis zur cRNA-Injektion in Barth-Medium (Tab. 2) bei 18°C. Die Operation erfolgte im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und wurde vom Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz am 30.08.2013 bzw. am 09.05.2018 genehmigt.

Nach fünf bis zwölf Stunden wurde zur Expression des mHCN2-Kanals cRNA in die Oozyten injiziert. Mittels Mikromanipulator wurde die Injektionspipette in die Oozyten eingestochen und mit manuell erzeugtem Überdruck 7-17 ng cRNA/Zelle verabreicht. Zur Herstellung der Injektionspipetten wurden Borosilikatkapillaren (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 2 mm und Innendurchmesser von 1,6 mm mit einem Pipettenziehgerät des Modells P-97 Flaming/Brown (Sutter Instruments Company, Novato, USA) gezogen und danach mit Hilfe eines dünnen Metalldrahtes unter dem Mikroskop abgebrochen, um eine kanülenartige Spitzenform zu erhalten. Verwendet wurden Injektionspipetten mit einer Öffnung von 6-12 µm. Nach Abschluss der Injektion wurden die Eizellen für zwei bis sieben Tage in 24-Loch-Zellkultur-Platten in Barth-Medium bei 18°C im Kühlbrutschrank inkubiert.

**Tabelle 1: Calciumfreie OR-2-Lösung (Oozyten-Ringer 2)**

NaCl	82,5 mM
KCl	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
TRIS-HEPES	5 mM
pH	7,4 (NaOH)

**Tabelle 2: Barth-Medium**

NaCl	84 mM
KCl	1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	2,4 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,82 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,33 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,41 mM
TRIS	7,5 mM
pH	7,4 (NaOH)

### 3.3 Patch-Clamp-Messungen

#### 3.3.1 Patch-Clamp-Messstand

Der Messstand wurde durch einen Faraday-Käfig elektrisch von der Umgebung abgeschirmt und befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Montiert waren ein inverses Mikroskop Axiovert 100 (Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) mit Achrostikmat-Objektiven 10-facher Vergrößerung und ein Objektisch, auf welchem sich die Messkammer befand. Ein Deckgläschen diente als Boden der Messkammer. Das Zuflusssystem bestand aus gekürzten Kanülen aus Chrom-Nickelstahl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm. Die Bad-Lösung (Tab. 3) und die verschiedenen Ligandenkonzentrationen (Tab. 4) befanden sich in mit Magneten an der Wand des Faraday-Käfigs befestigten 10 ml-Spritzen. Diese Spritzen wurden über dünne Kunststoffschläuche aus PTFE (Polytetrafluorethylen) mit den Metallröhrchen des Zuflusssystems der Messkammer verbunden. Pipettenhalter und Vorverstärker des Verstärkersystems EPC 10 USB (HEKA Elektronik, Lamprecht, Deutschland) wurden auf einen Mikromanipulator (Unit MRE/MLE (3 axes Mini 25)) mit Fernsteuereinheit SM1 (Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland) montiert. Durch eine seitliche Öffnung wurde der Pipettenhalter über einen flexiblen Kunststoffschlauch und einen Dreiwegehahn mit einer 5 ml-Spritze verbunden. Durch

diese Spritze konnte der Druck im Pipettenhalter verändert werden. Die Messkammer wurde mit einer Kaltlichtquelle beleuchtet. Als Badelektrode wurde ein Silberchloridpellet (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) verwendet. Die Pipettenelektrode bestand aus einem chlorierten Silberdraht. Mit Hilfe des Programms PatchMaster (HEKA Elektronik, Lamprecht, Deutschland) wurden die Signale aufgezeichnet und auf einem Bildschirm angezeigt.

**Tabelle 3: Bad-Lösung**

KCl	100 mM
EGTA	10 mM
HEPES	10 mM
pH	7,2 (KOH)

**Tabelle 4: Verwendete Ligandenkonzentrationen (BIOLOG LSI GmbH, Bremen)**

Ligand	Konzentration
cAMP	1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10µM, 1000 µM
2-Cl-cAMP	1 nM, 50 nM, 300 nM, 1 µM, 10 µM, 1000 µM
8-Cl-cAMP	1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM
N6-Phe-cAMP	1 nM, 3 nM, 5 nM, 10 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM
N6-Bn-cAMP	1 nM, 3 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 1000 µM
N6-Bnz-cAMP	1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1000 µM

### 3.3.2 Patch-Clamp-Messung

Mit Pinzetten wurde unmittelbar vor den Messungen die Vitellinmembran der Oozyte unter einem Stereomikroskop entfernt, sodass die Zellmembran frei lag. Mittels Glaspipette wurde die Eizelle anschließend in die mit Badlösung gefüllte Messkammer transportiert.

Zur Herstellung der Messpipetten wurden 7,5 cm lange Quarzglaskapillaren (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 1 mm und einem Innendurchmesser von 0,7 mm mit einem Pipettenziehgerät des Typs P-

2000 Laser Based (Sutter Instruments Company, Novato, USA) in zwei Heizschritten gezogen. Verwendet wurden Messpipetten mit Widerständen von 1 bis 2,6 MΩ. Die Messpipetten wurden mit der Pipetten-Lösung (Tab. 5) gefüllt. Dafür wurde eine mit dieser Lösung gefüllte Spritze mit Spritzenvorsatzfilter, der eine Porengröße von 0,2 µm besaß, (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich) genutzt. Die Messungen wurden in *Inside-out*-Konfiguration durchgeführt. In dieser wird der HCN2-Kanal nicht durch das intrazelluläre Milieu der Zelle beeinflusst. Die intrazelluläre Membranseite zeigte in Richtung des Applikationssystems, wodurch diese mit den verschiedenen Lösungen umspült werden konnte. Vor Eintauchen der Messpipette wurde ein Überdruck in dieser angelegt, um eine Verschmutzung der Pipettenöffnung zu verhindern. Dieser Überdruck wurde nach Kontakt der Messpipette mit der Zellmembran entlassen. Voraussetzung für die Messung ist ein sogenannter *Gigaseal*, eine sehr dichte Verbindung mit hohem elektrischem Widerstand zwischen Messpipette und Oozytenmembran. Bildete sich dieser nach Entlassen des Überdruckes nicht aus, wurde ein leichter Unterdruck angelegt. Nach erfolgreichem *Gigaseal* wurde durch schnelles Zurückfahren der Messpipette ein Membranstück aus der Zelle gerissen, Exzidieren genannt, und somit die *Inside-out*-Konfiguration erreicht. Anschließend wurde die Messpipette vor ein Zuflussrohr im Lösungsstrom des entsprechenden Liganden platziert. Bei *Patch-Clamp*-Experimenten an HCN-Kanälen tritt nach dem Exzidieren von *Patches* eine Abnahme der Stromamplitude und Verschiebung der Kanalaktivierung hin zu negativeren Membranpotentialen auf. Dieses Phänomen wird als *Rundown* bezeichnet (DiFrancesco et al. 1986). Erklären lässt sich dieser unter anderem durch den Verlust zytosolischer Modulatoren, wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) (Pian et al. 2006). Um ein Gleichgewicht nach Ablaufen des *Rundowns* zu erhalten, wurde eine Wartezeit von drei bis vier Minuten zwischen Exzidieren und Messbeginn eingehalten (Lyashchenko und Tibbs 2008).

**Tabelle 5: Pipetten-Lösung**

KCl	120 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
pH	7,2 (KOH)

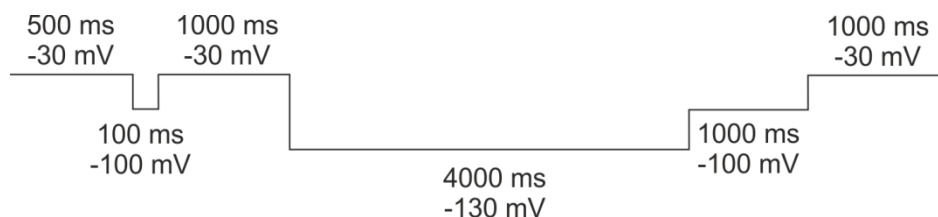
### 3.3.3 Messprotokoll

Die *Patch-Clamp*-Messungen wurden mit Hilfe des Programms PatchMaster durchgeführt und aufgezeichnet. Es wurden zwei Messprotokolle verwendet.

Protokoll 1 diente zur Überprüfung des Stromes vor dem Exzidieren (*Cell-attached*-Konfiguration). Einer für 100 ms angelegten Spannung von -30 mV folgten für 1,2 s -130 mV, welchen wiederum -30 mV für 100 ms nachfolgten. Die Abtastrate betrug 5 kHz.



Protokoll 2 diente der Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven (*Inside-out*-Konfiguration). Welche Spannung zu welchem Zeitpunkt anlag, ist der Skizze zu entnehmen. Dabei diente der erste -100 mV-Puls der Leckstrombestimmung, der -130 mV-Puls der Kanalaktivierung und der zweite -100 mV-Puls der Bestimmung des *Tail*-Stromes (siehe 3.4). Die Abtastrate betrug 2 kHz.



Die Dauer zwischen den einzelnen Traces betrug 15 s.

### 3.4 Datenanalyse

Um den Einfluss des Liganden cAMP auf das Schaltverhalten des HCN2-Kanals zu beschreiben, wurden die Stromkurven über die Zeit für die Konzentrationen 0,001  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 1000  $\mu$ M gemessen. Da der Kanal bei

10  $\mu\text{M}$  cAMP maximal aktiviert war, diente die Strommessung bei 10  $\mu\text{M}$  cAMP als Referenzwert für die Untersuchung des Einflusses der anderen Liganden. Die verwendeten Konzentrationen wurden den jeweiligen Wirkungen der Liganden auf das Schaltverhalten entsprechend angepasst. Für die cAMP-Analoga wurden somit Konzentrationen zwischen 0,001  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  (8-Cl-cAMP und N6-Phe-cAMP) bzw. 0,001  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  (2-Cl-cAMP, N6-Bn-cAMP und N6-Bnz-cAMP) gewählt.

Für die Analyse der Aktivierung im Gleichgewicht wurde die Amplitude des sogenannten *Tail*-Stromes bei einer auf die variable Kommandospannung folgenden Testspannung von -100 mV quantifiziert, um die gemessenen Ströme unabhängig vom elektrochemischen Gradienten über dem *Patch* auswerten zu können. Alle *Tail*-Ströme wurden um den Leckstrom korrigiert. Dieser wurde bei einer nicht-aktivierenden Spannung gemessen.

Zur Beschreibung der Ligandenabhängigkeit wurden die normierten Stromamplituden einer Kommandospannung gegen die Ligandenkonzentrationen aufgetragen und die Hill-Funktion an die experimentellen Daten angepasst (Gleichung 1).

$$\frac{I}{I_{max}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c}\right)^H}$$

#### **Gleichung 1: Hill-Funktion**

$I$	=	Stromstärke
$I_{max}$	=	Strom bei sättigender Spannung
$EC_{50}$	=	Konzentration bei halbmaximalem Effekt
$c$	=	Konzentration des Liganden
$H$	=	Hill-Koeffizient

Für Mittelwerte wurde der Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) angegeben. Die statistische Analyse der ermittelten Daten erfolgte mit dem Programm OriginPro 8.1G.

## 4 Ergebnisse

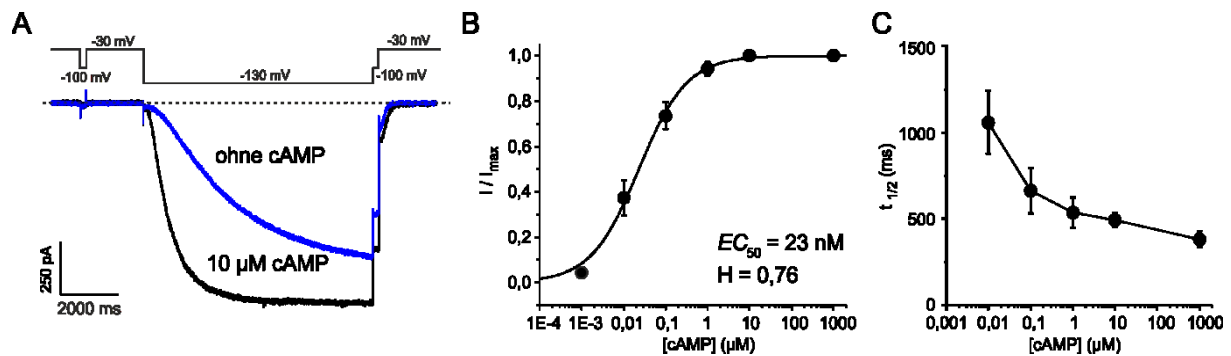
### 4.1 Wirkung des physiologischen Liganden cAMP auf den HCN2-Kanal

Wie bereits beschrieben (DiFrancesco 1999), ergab die Messung mit verschiedenen Konzentrationen des Liganden cAMP auch in den vorliegenden Experimenten, dass der durch Hyperpolarisation aktivierte HCN2-Kanal durch cAMP-Zugabe schneller aktiviert wurde und der Strom durch den Kanal größer wurde (Abbildung 5A). Das Verhältnis aus Gleichgewichtsstrom in Abwesenheit von cAMP zu Gleichgewichtsstrom bei sättigender cAMP-Konzentration betrug  $0,71 \pm 0,04$  ( $n = 15$ ).

Bei  $10 \mu\text{M}$  cAMP war der Kanal maximal aktiviert. Die halbmaximale Aktivierung  $EC_{50}$  war bei  $23 \text{ nM}$  cAMP erreicht (Abbildung 5B). Der Hill-Koeffizient betrug  $H = 0,76$  und deutete damit darauf hin, dass keine Kooperativität der Untereinheiten während des Schaltvorgangs vorlag. Allerdings ist die Aussagefähigkeit dieses Parameters bezüglich eines Mechanismus gering (Biskup et al. 2007).

Die Aktivierungsgeschwindigkeit wurde durch die halbmaximale Aktivierungszeit  $t_{1/2}$  quantifiziert. Je höher die applizierte cAMP-Konzentration war, desto schneller wurde der HCN2-Kanal aktiviert. Ohne Ligand war nach einer Zeit von  $1937 \text{ ms} \pm 295 \text{ ms}$  der halbmaximale Strom geflossen, bei cAMP Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$  lag  $t_{1/2}$  bei unter  $500 \text{ ms}$  (Abbildung 5C).





### Abbildung 5: Aktivierung des HCN2-Kanals durch cAMP

Dargestellt ist die Wirkung des Liganden cAMP auf den HCN2-Kanal.

A) Verglichen wird der Strom durch den Kanal ohne Zugabe von cAMP (blaue Kurve) mit dem Strom, welcher bei Zugabe von 10  $\mu$ M cAMP fließt.

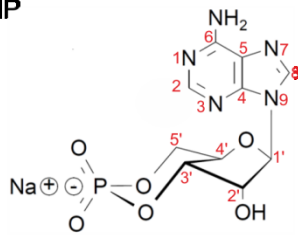
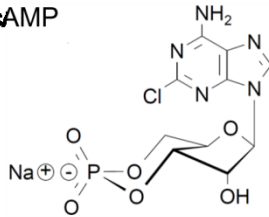
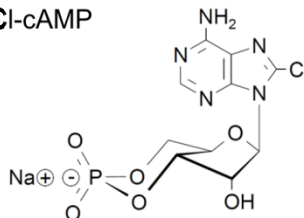
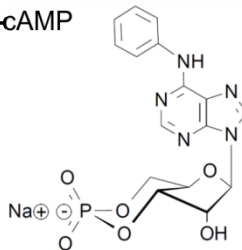
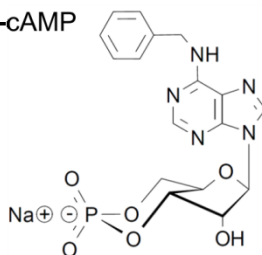
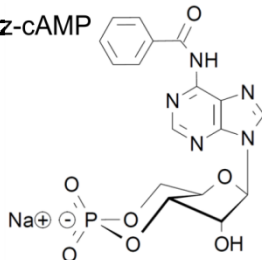
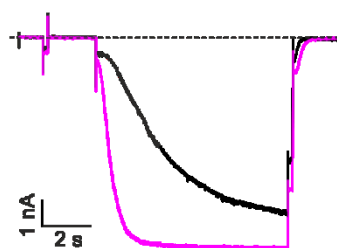
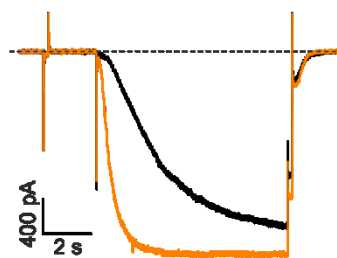
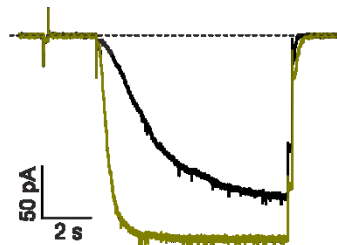
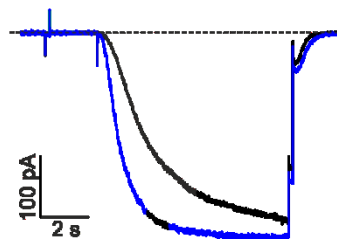
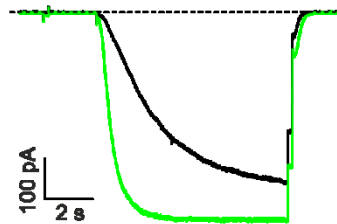
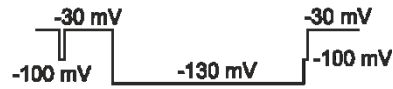
B) Zu sehen ist die Dosis-Wirkungs-Kurve für cAMP. Der  $EC_{50}$ -Wert liegt bei 23 nM cAMP, der Hill-Koeffizient beträgt  $H = 0,76$ .

C) Das Diagramm zeigt die halbmaximale Aktivierungszeit ( $t_{1/2}$ ) in Abhängigkeit von der cAMP-Konzentration.

## 4.2 Wirkung der getesteten cAMP-Analoga auf den HCN2-Kanal

Da der HCN2-Kanal ab einer cAMP-Konzentration von 10  $\mu$ M maximal aktiviert war, wurden für die ersten Tests der cAMP-Derivate auch 10  $\mu$ M Ligandenkonzentration verwendet.

Überraschenderweise führten alle getesteten cAMP-Analoga zu einer Aktivierung des HCN2-Kanals und sind nicht, wie bisher angenommen, selektive Aktivatoren der Proteinkinase A (Abbildung 6, vgl. auch mit cAMP in Abbildung 5A). Der Effekt der Analoga ist bei dieser Konzentration mit dem von cAMP vergleichbar (s. auch Abbildung 9).

**A****cAMP****2-Cl-cAMP****8-Cl-cAMP****N6-Phe-cAMP****N6-Bn-cAMP****N6-Bnz-cAMP****B**

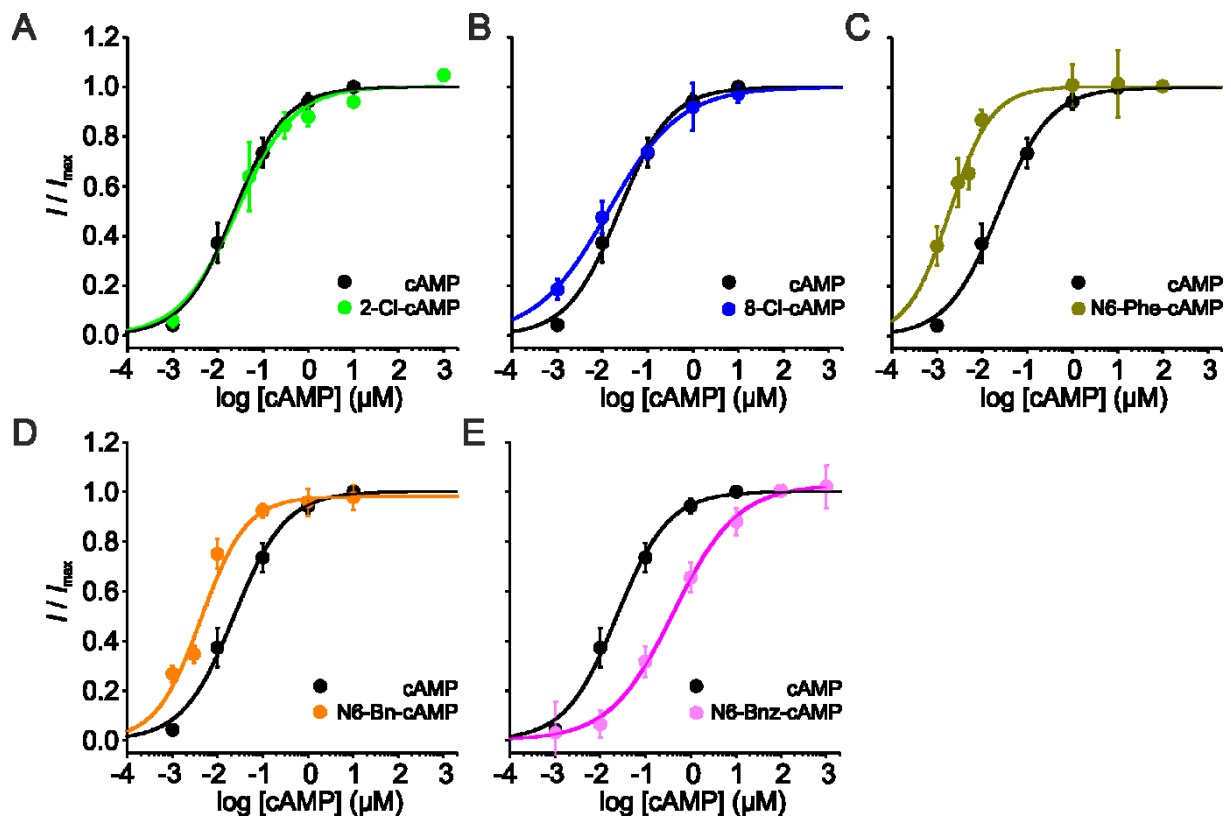
### Abbildung 6: Aktivierung des HCN2-Kanals durch cAMP-Analoga

Dargestellt sind die untersuchten cAMP-Analoga und deren aktivierende Wirkung auf den HCN2-Kanal. A) Die cAMP-Analoga und die jeweilige Strukturformel sind angegeben.

B) Verglichen wird der Strom durch den Kanal ohne Zugabe eines Liganden (schwarze Kurven) mit dem Strom, welcher bei Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  des jeweiligen cAMP-Analogons fließt (farbige Kurven).

### 4.3 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der getesteten cAMP-Analoga

Für alle in dieser Arbeit untersuchten Liganden wurden die Dosis-Wirkungs-Beziehungen gemessen. In den Darstellungen sind die Mittelwerte aus mehreren Messungen für alle getesteten Liganden abgebildet (Abbildung 7). Es wurde die Hill-Gleichung an die Daten angepasst, wobei die Mittelwerte verwendet wurden und nicht jede einzelne Messung. Aus dem *Fit* ergaben sich  $EC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten.

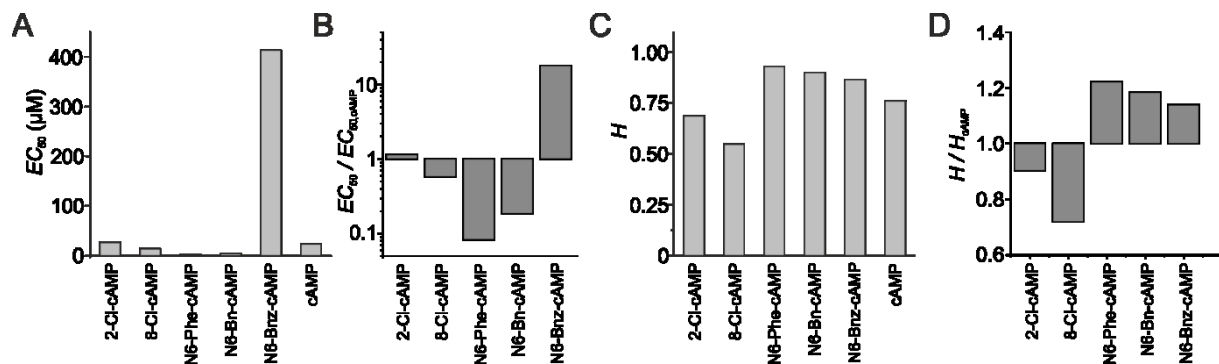


**Abbildung 7: Dosis-Wirkungs-Kurven der cAMP-Analoga**

Abgebildet sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von A) 2-Cl-cAMP, B) 8-Cl-cAMP, C) N6-Phe-cAMP, D) N6-Bn-cAMP und E) N6-Bnz-cAMP jeweils im Vergleich mit der Dosis-Wirkungs-Kurve von cAMP (schwarze Kurven).

Die  $EC_{50}$ -Werte der verschiedenen Liganden unterschieden sich. Von 8-Cl-cAMP, N6-Phe-cAMP und N6-Bn-cAMP waren im Vergleich zu cAMP niedrigere Konzentrationen notwendig, um eine halbmaximale Aktivierung zu erreichen. Die

niedrigsten  $EC_{50}$ -Werte wurden für N6-Phe-cAMP mit 1,92 nM, gefolgt von N6-Bn-cAMP (4,3 nM) und 8-Cl-cAMP (13,3 nM) bestimmt. Der  $EC_{50}$ -Wert von 2-Cl-cAMP unterschied sich mit 26,3 nM nur marginal von der Konzentration bei halbmaximalem Effekt von cAMP. N6-Bnz-cAMP führte zu einem deutlich höheren  $EC_{50}$ -Wert als cAMP. Mit 413 nM war er um das 17,9-fache gegenüber cAMP erhöht (Abbildung 8A und Abbildung 8B).



#### Abbildung 8: $EC_{50}$ und Hill-Koeffizienten

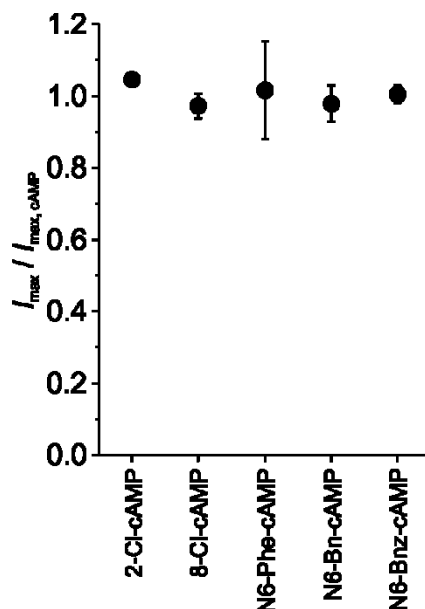
In den Diagrammen sind A) die  $EC_{50}$ -Werte aller Liganden, B) die  $EC_{50}$ -Werte der cAMP-Analoga im Verhältnis zum  $EC_{50}$ -Wert von cAMP, C) die Hill-Koeffizienten aller Liganden und D) die Hill-Koeffizienten der cAMP-Derivate im Verhältnis zum Hill-Koeffizienten von cAMP dargestellt.

Auch der Hill-Koeffizient unterschied sich zwischen den chemisch modifizierten cAMP-Derivaten. N6-Phe-cAMP, N6-Bn-cAMP und N6-Bnz-cAMP hatten einen im Vergleich zu cAMP um das 1,2-fache, 1,2-fache bzw. 1,1-fache erhöhten Hill-Koeffizienten. Bei den anderen zwei Analoga war der Hill-Koeffizient verringert. Am niedrigsten war er bei 8-Cl-cAMP mit 0,5, gefolgt von 2-Cl-cAMP mit 0,7 (Abbildung 8C und Abbildung 8D). Unterschiede der Hill-Koeffizienten dieser Größenordnung sind als gering und als eher nicht relevant einzuordnen.

Der t-Test (Students-Test) für  $EC_{50}$  und Hill-Koeffizient konnte nicht angewendet werden, da sich die Fitergebnisse durch Anpassung der Hill-Funktion an gemittelte relative Ströme ergaben und nicht die Einzelmessungen gefittet wurden.

## 4.4 Effizienz der getesteten cAMP-Analoga im Vergleich zu cAMP

Zur Beurteilung der Effizienz der verschiedenen cAMP-Analoga wurde deren Gleichgewichtsstrom am Ende des -130 mV-Pulses ins Verhältnis zum Gleichgewichtsstrom bei cAMP-Zugabe gesetzt. Verglichen wurden die Ströme bei 10  $\mu\text{M}$  Ligandenkonzentration. Dies wurde für jede Messung gemacht und das Ergebnis danach gemittelt (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Effizienz der cAMP-Derivate**

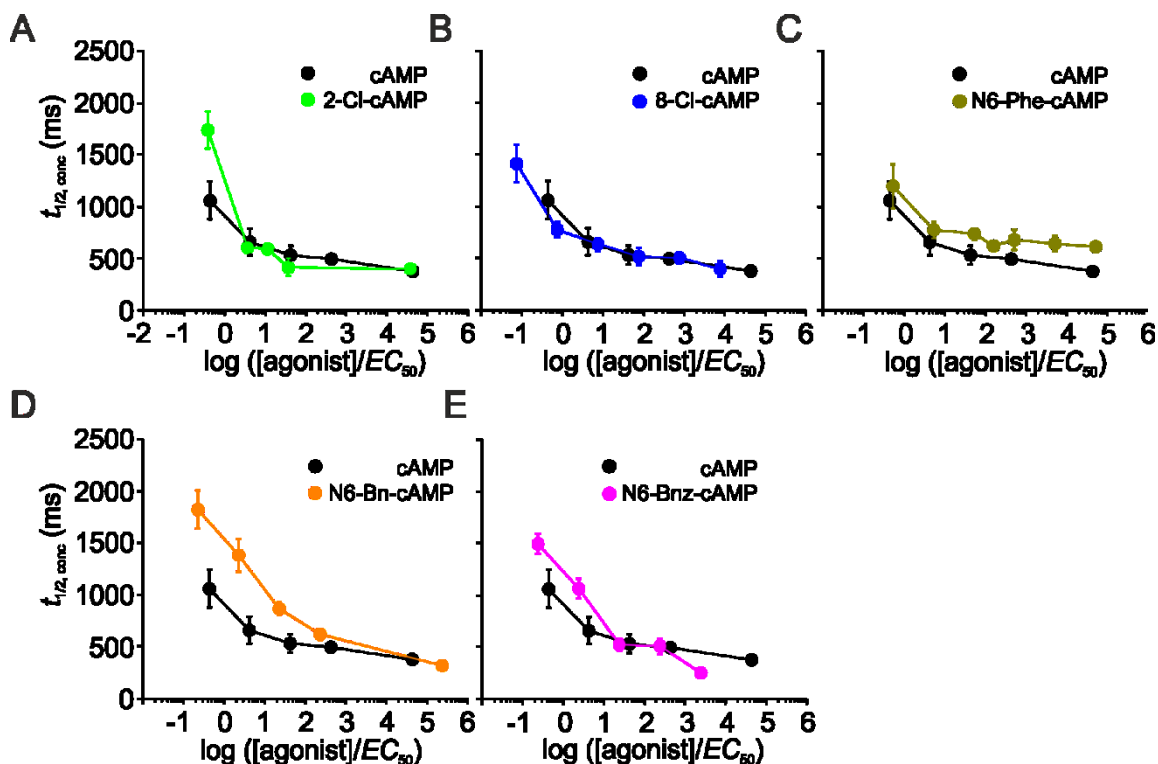
Die Mittelwerte der Gleichgewichtsströme der cAMP-Derivate werden mit dem Mittelwert des Gleichgewichtsstromes von cAMP verglichen. Es handelt sich um die Ströme am Ende des -130 mV-Pulses bei 10  $\mu\text{M}$  Ligandenkonzentration.

Der maximal mögliche Strom durch den HCN2-Kanal war bei allen Liganden unverändert groß, wurde aber bei unterschiedlichen Konzentrationen erreicht (s. auch Abbildung 7).

## 4.5 Konzentrationsabhängige Aktivierungskinetik der getesteten Analoga

Da die  $EC_{50}$ -Werte der Liganden unterschiedlich waren, wurde die halbmaximale Aktivierungszeit ( $t_{1/2,conc}$ ) gegen die normierte Konzentration (applizierte Konzentration/ $EC_{50}$ ) aufgetragen. Dadurch sind die Kurven der cAMP-Analoga mit der cAMP-Kurve im gleichen Aktivierungszustand des HCN2-Kanals vergleichbar.

Die Aktivierungskinetik der cAMP-Analoga unterschied sich nur unwesentlich von der des nativen cAMP's (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Konzentrationsabhängige Aktivierungskinetik**

Dargestellt ist die halbmaximale Aktivierungszeit  $t_{1/2,conc}$  in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand des Kanals (applizierte Konzentrationen, dividiert durch den  $EC_{50}$  des jeweiligen Liganden: A) 2-Cl-cAMP, B) 8-Cl-cAMP, C) N6-Phe-cAMP, D) N6-Bn-cAMP und E) N6-Bnz-cAMP). Zum Vergleich ist in jeder Graphik die schwarze Kurve der Aktivierungskinetik für cAMP abgebildet.

## 5 Diskussion

### 5.1 cAMP-Wirkung auf den HCN2-Kanal

Zur Untersuchung des cAMP-Einflusses auf den HCN2-Kanal wurde mit der Patch-Clamp-Technik an *Inside-out*-Makropatches gemessen, wie sich der Strom durch den Kanal bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen verhält. Durchgeführt wurden die Messungen an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* nach Injektion von mHCN2-RNA. Von den verschiedenen HCN-Kanal-Isoformen wurde der HCN2-Kanal für die Experimente dieser Arbeit gewählt, da er stärker cAMP-abhängig ist als der HCN1- und HCN3-Kanal und somit Unterschiede zwischen den Liganden deutlicher werden. Zwar zeigt der HCN4-Kanal auch eine deutliche cAMP-Abhängigkeit, er exprimiert im Gegensatz zum HCN2-Kanal aber nur schlecht in *Xenopus*-Oozyten. Wie bei allen anderen Experimenten am Institut für Physiologie II des Universitätsklinikums Jena wurde HCN2-RNA der Maus verwendet, da sie eine hohe Sequenzhomologie (90,6%) zur humanen HCN2-RNA aufweist.

Da der HCN2-Kanal durch Hyperpolarisation aktiviert wird, war auch ohne Ligandenzugabe nach Anlegen hyperpolarisierender Spannungen zwischen -90 und -150 mV der für den Kanal typische Strom zu sehen. Durch Zugabe von cAMP wurde dieser Strom verstärkt (s. Abbildung 5A). Bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  cAMP nahm er konzentrationsabhängig zu (s. Abbildung 5B). Die maximale Stromamplitude wurde somit durch Applikation von 10  $\mu\text{M}$  cAMP um  $41 \pm 6 \%$  erhöht. Als Ligandenkonzentration, welche den halbmaximalen Effekt bewirkt, wurde  $EC_{50} = 23 \text{ nM}$  bestimmt.

Die Aktivierungsgeschwindigkeit wurde durch die halbmaximale Aktivierungszeit  $t_{1/2}$  quantifiziert. Je höher die applizierte cAMP-Konzentration war, desto schneller wurde der HCN2-Kanal aktiviert. Ohne Ligand floss nach einer Zeit von  $1937 \text{ ms} \pm 295 \text{ ms}$  der halbmaximale Strom, bei cAMP Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$  lag  $t_{1/2}$  bei unter 500 ms (s. Abbildung 5C).

Diese Messergebnisse entsprechen in etwa den Werten, welche auch in früheren Arbeiten unter vergleichbaren Messbedingungen gemessen wurden (Wainger et al. 2001, Sunkara et al. 2018).

## **5.2 Wirkung der cAMP-Analoga auf den HCN2-Kanal**

### **5.2.1 Auswahl der Analoga**

Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche verschiedene cAMP-Analoga synthetisiert und funktionell beschrieben. Für diese Arbeit wurden fünf von ihnen auf ihre bisher unbekannte Wirkung auf den HCN2-Kanal untersucht.

8-Cl-cAMP ist ein cAMP-Analogon, bei welchem das Wasserstoffatom am C8-Atom der Nukleinbase durch ein Chloratom ersetzt wurde. Es wird als potenter Stimulator von cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA) beschrieben. Es hat eine hohe Affinität für die Bindungsstellen A und B der Proteinkinase A Typ I (PKA I) (Cho-Chung 1990) und für die Bindungsstelle B der Proteinkinase A Typ II (PKA II) (Ally et al. 1988).

Eine starke Aktivität der PKA I wirkt proliferationsfördernd auf Zellen, während die PKA II-Aktivität mit einer Wachstumshemmung einhergeht (Neary et al. 2004, Sapio et al. 2014). Für viele Krebszellarten wurde gezeigt, dass unkontrolliertes Wachstum und maligne Entartung mit erhöhter Expression der regulatorischen Untereinheiten der PKA I oder Veränderungen des PKA I/PKA II-Verhältnisses einhergehen (Bossis und Stratakis 2004). Für 8-Cl-cAMP wurde sowohl in vitro als auch in vivo ein antiproliferativer Effekt auf Krebszellen beschrieben (Ally et al. 1989, Grbovic et al. 2002, Juranic et al. 1998). Es ist das erste cAMP-Analogon, welches in klinischen Studien untersucht wurde (Tortora et al. 1995, Propper et al. 1999). Der das Krebswachstum hemmende Effekt des 8-Cl-cAMP's basiert wahrscheinlich auf einer Herunterregulierung der PKA I über komplexe Mechanismen, welche bisher noch nicht vollständig erforscht sind.

Obwohl 8-Cl-cAMP seit über drei Jahrzehnten wegen seines wachstumshemmenden Effektes auf mehrere Krebszellarten intensiv untersucht wird (Katsaros et al. 1987,



Rohlf et al. 1993, Dicitore et al. 2016, Grassi et al. 2017), wurde eine mögliche Kreuzreaktion über die HCN-Kanäle bisher nicht getestet.

2-Cl-cAMP ist ein cAMP-Analogon, bei dem das Wasserstoffatom am C2-Atom des Adenins durch ein Chloratom ersetzt wurde. Es wird als selektiver Stimulator mit hoher Affinität für die Bindungsstelle B von Proteinkinase A Typ I und Typ II beschrieben (Ogreid et al. 1989, Zorn et al. 1995). Dieses Analogon aktiviert die PKA I stärker als das native cAMP, was darauf zurückgeführt wird, dass Chlor zu den Elektronen-entziehenden Substituenten gehört. Im Falle von 2-Cl-cAMP entzieht das Chlor dem Purinring die Elektronen (Yagura et al. 1980). Weil andere raumgreifende Substituenten an der C2-Position, im Gegensatz zum Chlor, die Aktivierung der Proteinkinase A beeinträchtigen (Ogreid und Doskeland 1982, Yagura et al. 1980, Miller 1981), wurde 2-Cl-cAMP in diese Arbeit eingeschlossen, um zu testen, ob es auch auf den HCN2-Kanal einen außergewöhnlichen Effekt hat.

Wie 8-Cl-cAMP, zeigen auch cAMP-Analoga, welche an der Aminogruppe bei Position 6 des Adenins modifiziert wurden, eine potente Wachstumshemmung verschiedener Krebszelltypen. Die antitumoröse Wirkung basiert allerdings auf einem anderen Wirkmechanismus als die des 8-Cl-cAMP's (Katsaros et al. 1987), was die Möglichkeit eröffnet, durch gleichzeitige Gabe beider Derivattypen einen synergistischen Effekt gegen das Krebswachstum zu erreichen. Dies wurde bisher für N6-Bn-cAMP (Pepe et al. 1991, Katsaros et al. 1987) und N6-Bnz-cAMP (Katsaros et al. 1987) überprüft und bestätigt.

N6-Phe-cAMP wurde in mehreren Studien verabreicht, um selektiv Proteinkinase A-Enzyme in verschiedenen Zelltypen, wie Myofibroblasten (Lu et al. 2013), Cholangiozyten (Banales et al. 2009) oder frisch isolierten Aortazellen (Kloss et al. 2004) zu aktivieren.

Alle drei am N6-Atom modifizierten cAMP-Analoga wurden auch zur Klärung von anderen Fragestellungen, wie der cAMP induzierten Stimulation von Phosphodiesterasen, untersucht (Jager et al. 2012).

Durch die weitreichende Verwendung von N6-modifizierten cAMP-Analoga zur selektiven PKA-Aktivierung fanden drei verschiedene Analoga dieser Art Eingang in die vorliegende Studie.

### 5.2.2 Potenz der Analoga

Überraschenderweise hatten alle fünf getesteten Analoga einen stimulierenden Effekt auf die HCN2-Kanalaktivierung. Daher wurden für alle Liganden die Dosis-Wirkungs-Beziehungen gemessen (s. Abbildung 7). Es wurde die Hill-Gleichung an die Daten angepasst, wobei die Mittelwerte verwendet wurden und nicht jede einzelne Messung. Aus dem *Fit* ergaben sich  $EC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten.

Die  $EC_{50}$ -Werte der verschiedenen Liganden unterschieden sich. Von 8-Cl-cAMP, N6-Phe-cAMP und N6-Bn-cAMP waren im Vergleich zu cAMP niedrigere Konzentrationen notwendig, um eine halbmaximale Aktivierung zu erreichen. Die niedrigsten  $EC_{50}$ -Werte wurden für N6-Phe-cAMP mit 1,92 nM, gefolgt von N6-Bn-cAMP (4,3 nM) und 8-Cl-cAMP (13,3 nM) bestimmt.

Der  $EC_{50}$ -Wert von 2-Cl-cAMP unterschied sich mit 26,3 nM nur marginal von der Konzentration bei halbmaximalem Effekt von cAMP.

N6-Bnz-cAMP zeigte einen deutlich höheren  $EC_{50}$ -Wert als cAMP. Mit 413 nM war er um das 17,9-fache gegenüber cAMP erhöht (s. Abbildung 8A und Abbildung 8B).

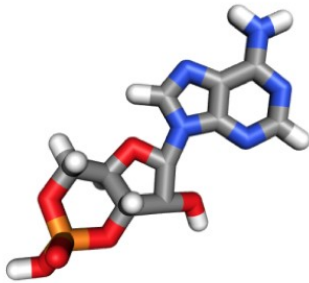
Die ermittelten Hill-Koeffizienten unterschieden sich nur geringfügig.

Um zu verstehen, wieso sich die Potenzen der Analoga unterscheiden, muss man sich vor Augen führen, wie deren Bindung zum HCN2-Kanal variiert. Es ist gut untersucht, wie das native cAMP in der Bindungstasche des HCN-Kanals sitzt (Abbildung 11). cAMP bindet an die CNBD des HCN-Kanals. Diese besitzt zwischen den verschiedenen HCN-Kanaltypen eine hohe Sequenzhomologie, wodurch die Verbindung zwischen Ligand und Kanal bei den Subtypen vergleichbar ist (Kaupp und Seifert 2001).

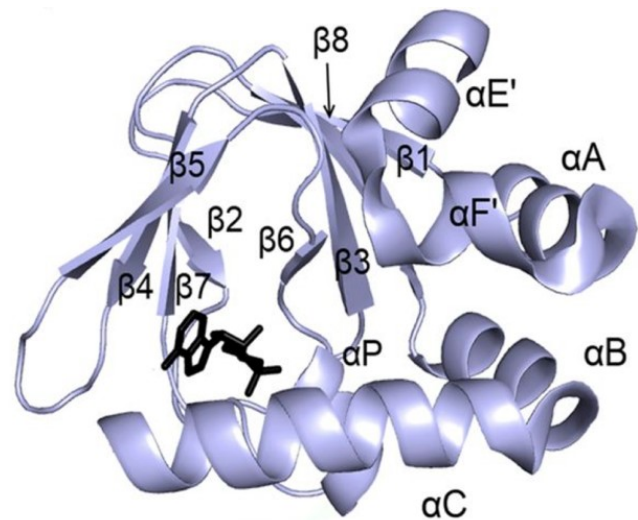
Die Bindungstasche besteht aus drei Alpha-Helices ( $\alpha A$ ,  $\alpha B$ ,  $\alpha C$ ) und einer achtsträngigen Beta-Rolle, die wiederum eine kurze Alpha-Helix ( $\alpha P$ ) enthält (Abbildung 11B). Die Bindungstasche für die zyklischen Nukleotide wird durch diese Beta-Rolle geformt. Sie beinhaltet mehrere Aminosäurereste, welche spezifische elektrostatische Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit gebundenen zyklischen Nukleotiden ausbilden (James und Zagotta 2018, Zagotta et al. 2003, Zhou und Siegelbaum 2007).

Es bestehen hydrophobe Bindungskräfte, Ionenbindungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Ribose mit der Phosphodiestergruppe des cAMP's und der CNBD des HCN-Kanals. Das äquatorial gelegene Sauerstoffatom der zyklischen Phosphodiestergruppe bildet Ionenbindungen mit den Aminosäuren Arg538, Arg618 und Arg669 und Wasserstoffbrückenbindungen mit Cys531, Cys611 und Cys662 aus. Mutationen dieser Arginine führen zu einer drastischen Affinitätsreduktion bezüglich der cAMP-Bindung (Chen et al. 2001). Das axial gelegene Sauerstoffatom bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit Thr539, Thr619 und Thr670. Die 2'-Hydroxygruppe der Ribose bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit Gly528, Gly608 und Gly659 und mit Glu529, Glu609 und Glu660. Auch das Adenin geht hydrophobe Bindungen mit den Aminosäuren der CNBD ein. Zwischen dem Adenin und den Aminosäuren der C-terminalen Region des HCN-Kanals bildet sich eine hydrophobe „Sandwichformation“ aus. Durch die drei Aminosäuren Arginin, Isoleucin und Lysin in der C-Helix des HCN-Kanals wird cAMP stärker gebunden als cGMP, wodurch der Kanal cAMP-spezifisch ist (Berman et al. 2005, Moller et al. 2014).

A



B



### Abbildung 11: cAMP und CNBD

A) Dreidimensionales Modell des nativen cAMP's. Die Kohlenstoffatome sind grau, die Wasserstoffatome weiß, die Sauerstoffatome rot, das Phosphatatom orange und die Stickstoffatome blau dargestellt.

B) Die Struktur der *Cyclic Nucleotide-Binding Domain* mit ihren drei Alpha-Helices ( $\alpha A$ ,  $\alpha B$ ,  $\alpha C$ ) und der achtsträngigen Beta-Rolle, die wiederum eine kurze Alpha-Helix ( $\alpha P$ ) enthält ist dargestellt. Das cAMP ist als schwarze Figur gezeigt. Bei  $\alpha E'$  und  $\alpha F'$  handelt es sich um Teile des C-Linkers.

Nach der Bindung von zyklischen Nukleotiden an die CNBD rotieren die  $\alpha B$ - und  $\alpha C$ -Helices gemeinsam in Richtung der Beta-Rolle. Dies ermöglicht der  $\alpha C$ -Helix, mit der basischen Gruppe der zyklischen Nukleotide zu interagieren und dadurch die Bindungstasche zu bedecken (Varnum et al. 1995, Zagotta et al. 2003, Akimoto et al. 2014). Durch den Aufbau der Beta-Rolle wird somit die Bindungsaffinität verschiedener Nukleotide bestimmt und durch die  $\alpha C$ -Helix die Effizienz der Kanalaktivierung bei Bindung verschiedener Nukleotide gesteuert (Zhou und Siegelbaum 2007, Varnum et al. 1995, Flynn et al. 2007).

Im Folgenden wird diskutiert, wie die chemischen Modifikationen das Bindungsverhalten beeinflussen könnten.

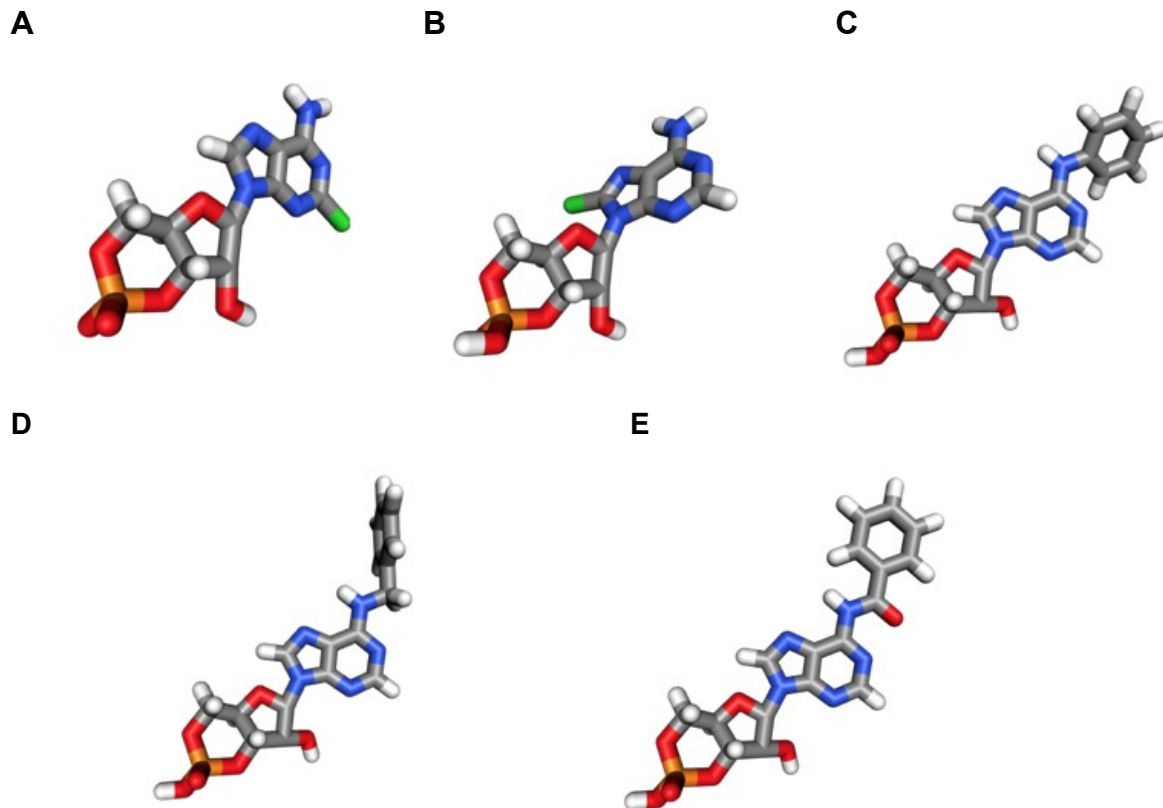
Da sich die Affinität des 2-Cl-cAMP's zum HCN2-Kanal nicht von der des nativen cAMP's unterscheidet, scheint das zusätzliche Chlor am C2-Atom die Bindung des

Liganden zur CNBD des HCN2-Kanals nicht wesentlich zu beeinflussen (Abbildung 12A).

Modifikationen am C8-Atom des cAMP's gehen mit einer erhöhten Affinität für HCN-Kanäle einher (Moller et al. 2014). Erklären lässt sich die gesteigerte Affinität durch stärkere hydrophobe Bindungen zwischen modifiziertem Ligand und HCN-Kanal (Otte et al. 2018). Dies ist vermutlich auch der Grund für die in der vorliegenden Arbeit beschriebene geringfügig höhere Potenz des 8-Cl-cAMP's gegenüber cAMP (Abbildung 12B).

Für N6-Bn-cAMP und N6-Phe-cAMP wurden noch höhere Affinitäten/niedrigere  $EC_{50}$ -Werte als für 8-Cl-cAMP bestimmt. Über die Ursache lässt sich aktuell nur spekulieren. Der aromatische Ring der N6-Analoga sitzt nach Bindung an den HCN-Kanal am Eingang der Bindungsstelle. Ursächlich für die hohe Affinität könnte also sein, dass der aromatische Ring dort mit Aminosäuren des HCN-Kanals interagiert. Am wahrscheinlichsten handelt es sich dabei um Arg635, welches sich unmittelbar dort befindet (Zagotta et al. 2003, Lee und MacKinnon 2017). Bei der Bindung zwischen aromatischem Ring und der positiven Ladung des Arginins könnte es sich um eine *Cation- $\pi$* -Interaktion handeln. Eine *Cation- $\pi$* -Interaktion ist eine nichtkovalente Bindung zwischen einem elektronenreichen  $\pi$ -System, im Falle der N6-Analoga ist dies der aromatische Ring, und einer angrenzenden positiven Ladung, in diesem Fall geliefert durch die positiv geladene Seitenkette des Arginins (Abbildung 12C und 12D).

Da für N6-Bnz-cAMP eine geringere Affinität zum HCN2-Kanal als die des nativen cAMP's bestimmt wurde, muss hier eine andere Reaktion stattfinden. Möglich wäre eine sterische Behinderung durch die sich von den anderen N6-Analoga unterscheidende Rotation der großen Benzoylgruppe in das Arg635 hinein (Abbildung 12E).



**Abbildung 12: cAMP-Analoga dreidimensional**

Dreidimensionale Modelle der cAMP-Analoga. Die Kohlenstoffatome sind grau, die Wasserstoffatome weiß, die Sauerstoffatome rot, die Phosphatatom orange, die Stickstoffatome blau und die Chloratome grün dargestellt.

- A) 2-Cl-cAMP
- B) 8-Cl-cAMP
- C) N6-Phe-cAMP
- D) N6-Bn-cAMP
- E) N6-Bnz-cAMP

### 5.2.3 Effizienz und Aktivierungskinetik der Analoga

Zur Beurteilung der Effizienz der verschiedenen cAMP-Analoga wurde deren Gleichgewichtsstrom am Ende des -130 mV-Pulses ins Verhältnis zum Gleichgewichtsstrom bei cAMP-Zugabe gesetzt (vgl. Abbildung 5 und 6). Verglichen wurden die Ströme bei 10  $\mu$ M Ligandenkonzentration. Dies wurde für jede Messung durchgeführt und das Ergebnis danach gemittelt (s. Abbildung 9). Der maximal mögliche Strom durch den HCN2-Kanal war bei allen Liganden unverändert groß, wurde aber bei unterschiedlichen Konzentrationen erreicht (vgl. Abbildung 7 und 9). N6-Phe-cAMP und N6-Bn-cAMP erreichten den maximalen Effekt schon nahezu bei

einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$ , N6-Bnz-cAMP erst bei 100  $\mu\text{M}$ . Erklären lassen sich diese Unterschiede wieder durch die verschiedenen Affinitäten.

Dass die chemischen Modifikationen die Affinität, also das Bindungsverhalten, beeinflussen, aber nicht die Effizienz, also den Effekt auf das Kanalschalten, zeigt, dass die Konformationsänderungen, die auf die Ligandenbindung folgen, für alle hier getesteten Liganden gleichartig ablaufen.

Die Aktivierungskinetik beschreibt, wie schnell der Kanal einen bestimmten Aktivierungszustand erreicht. Durch die verschiedenen Affinitäten der Analoga zum HCN2-Kanal wurden vergleichbare Aktivierungszustände bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen erreicht. Daher wurde die Aktivierungskinetik nicht gegen die absolute Konzentration, sondern gegen die normierte Konzentration  $[\text{Ligand}]/EC_{50}$  aufgetragen. Nach Normierung der Konzentration unterschieden sich die Aktivierungskinetiken der cAMP-Analoga untereinander und im Vergleich mit cAMP jedoch nur unwesentlich (s. Abbildung 10). Dies ist ein weiteres Argument dafür, dass die Konformationsänderungen, die auf die Ligandenbindung folgen, nicht von der Art des Liganden abhängen.

#### **5.2.4 Selektivität der Analoga**

Für alle in dieser Arbeit getesteten cAMP-Derivate wurde bisher eine Selektivität für die Proteinkinase A angenommen. Die Ergebnisse der Experimente zeigen jedoch, dass auch der HCN2-Kanal von ihnen aktiviert wird, teilweise sogar mit höherer Affinität als durch das native cAMP. Dies wirft die Frage auf, ob man die Analoga überhaupt noch als PKA-selektive Liganden bezeichnen und nutzen kann.

Vergleicht man die gemessenen Affinitäten der Liganden für den HCN2-Kanal mit den in anderen Arbeiten gemessenen Affinitäten für die PKA (Ogreid et al. 1985, Zorn et al. 1995, Poppe et al. 2008, Chepurny et al. 2013), stellt sich heraus, dass die cAMP-Analoga an die PKA und den HCN2-Kanal mit ähnlich starken Affinitäten binden. Um die Affinitätsverbesserung oder -verschlechterung im Vergleich zu cAMP für PKA und HCN2-Kanal zu vergleichen, wurden in Abbildung 13 die relativen Affinitäten dargestellt.

Es zeigte sich, dass die beiden Chlor-Modifizierungen keine starken Unterschiede in den Affinitäten zwischen PKA und HCN2-Kanal hervorrufen, was diese beiden Kandidaten für die Diskriminierung ungeeignet macht.

Das Analogon N6-Phe-cAMP hatte zwar eine erhöhte Affinität zum HCN2-Kanal, aber auch zur PKA. Damit ist auch diese Modifizierung ungeeignet, zwischen den beiden Proteinen zu diskriminieren.

N6-Bn-cAMP hatte eine erhöhte Affinität zum HCN2-Kanal, aber eine geringere für die PKA. Damit ist mit dieser Modifizierung eventuell eine Diskriminierung zugunsten des HCN2-Kanals möglich, insbesondere beim Vergleich von HCN2-Kanal zur PKA I, bei dem sich für die PKA I im Mittel sogar eine geringfügige Verschlechterung der Affinität zeigte (gefüllte orangefarbene Symbole in Abbildung 13).

Der vielversprechendste Kandidat zur Proteindiskriminierung ist allerdings das N6-Bnz-cAMP (rosa Kreise in Abbildung 13). Für dieses zeigte sich eine geringe Affinität zum HCN2-Kanal, aber eine nahezu unveränderte Affinität zur PKA. Damit könnte durch eine geschickte Wahl des Konzentrationsbereiches eine gezielte Beeinflussung der PKA möglich sein, ohne dass der HCN-Kanal aktiviert wird.

Eine Möglichkeit die Selektivität in Richtung Proteinkinase A oder HCN-Kanal zu steigern wäre, die Affinitäten der Liganden bezüglich des Zielproteins zu verändern und die zu anderen Proteinen zu bewahren oder, optimalerweise, in die Gegenrichtung zu verschieben.

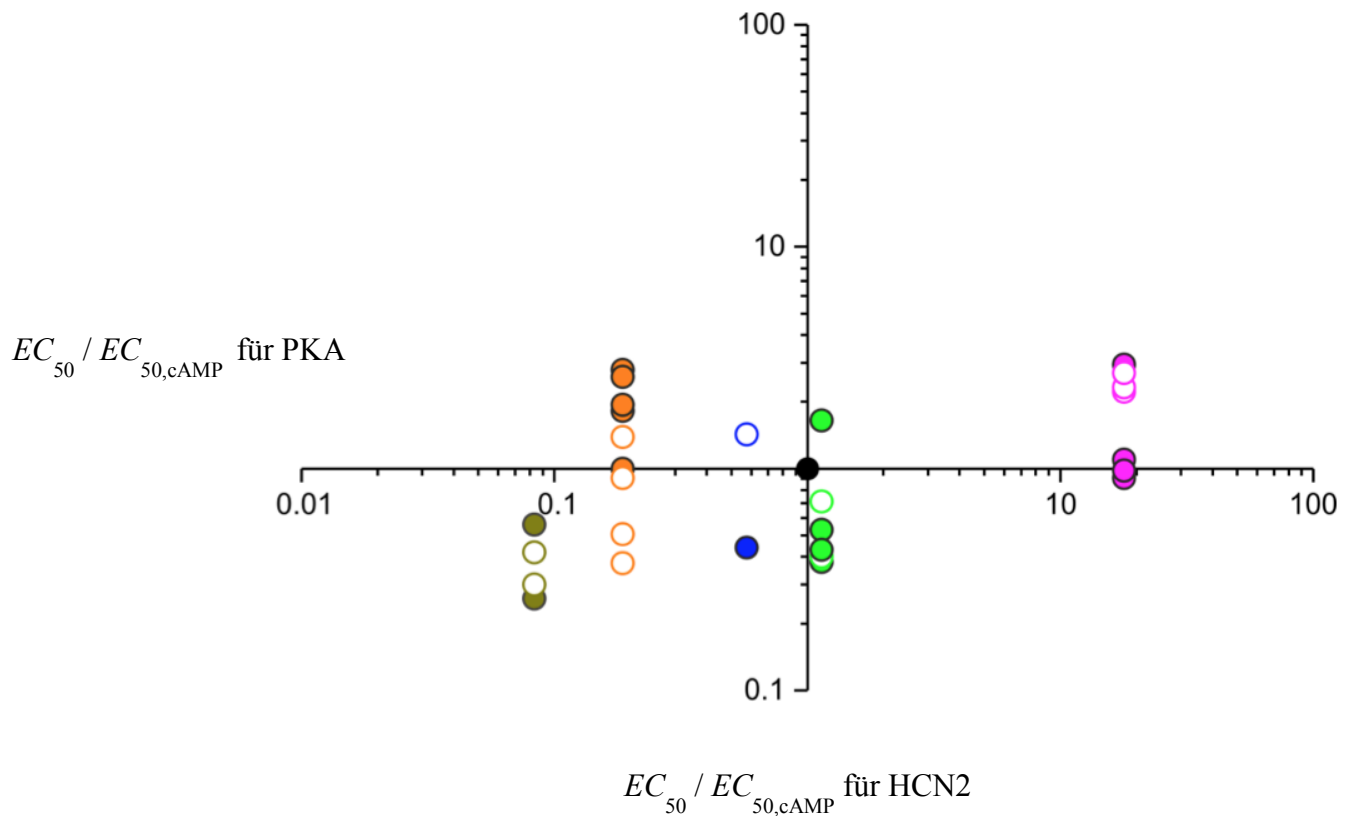
Das für die erhöhten Affinitäten des N6-Phe-cAMP's und N6-Bn-cAMP's bzw. für die verringerte Affinität des N6-Bnz-cAMP's zum HCN2-Kanal als ursächlich vermutete Arg635 befindet sich an dieser Stelle nur am HCN2-Kanal und nicht an der PKA. Dieser Umstand macht diese Region zum möglichen Ziel zur Proteindiskriminierung.

N6-Phe-cAMP und N6-Bn-cAMP zeigten sich in dieser Arbeit als Liganden mit hoher Affinität für den HCN2-Kanal, allerdings ist auch eine starke Affinität zur PKA bekannt (Abbildung 13). Sollte für die hohe Affinität der N6-modifizierten cAMP-Analoga zum HCN2-Kanal tatsächlich eine *Cation- $\pi$* -Interaktion ursächlich sein, könnte man diese beeinflussen, um die Affinität zum HCN2-Kanal zu senken, ohne die zur PKA zu verändern. Möglich wäre in diesem Fall ein Anbringen von elektronenbindenden Atomen am aromatischen Ring, welche die für die *Cation- $\pi$* -Interaktion



verantwortlichen Elektronen aus der Bindung ziehen, aber die Bindung zur PKA unbeeinflusst lassen.

Der Affinitätsvergleich zeigt außerdem, dass N6-Bnz-cAMP eine eher geringe Affinität zum HCN2-Kanal, aber eine hohe Affinität zur PKA hat (rosa Kreise in Abbildung 13). Man könnte die als ursächlich vermutete sterische Behinderung durch weitere chemische Modifikationen noch verstärken, dadurch die Affinität zum HCN2-Kanal weiter senken und somit die Selektivität zur PKA erhöhen.



### Abbildung 13: Affinitätsvergleich der Liganden bei PKA und HCN2-Kanal

Dargestellt sind die Affinitäten der untersuchten Liganden zum HCN2-Kanal im Vergleich zu den Affinitäten zur PKA. Die gefüllten Kreise stehen für die Affinität zur PKA I, die leeren Kreise für die Affinität zur PKA II. Die  $EC_{50}$ -Werte für die PKA stammen aus den Publikationen: OGREID et al. 1985, ZORN et al. 1995, POPPE et al. 2008 und CHEPURNY et al. 2013, die  $EC_{50}$ -Werte für den HCN2-Kanal sind die in dieser Arbeit gemessenen.

Schwarz: cAMP  
 Olivgrün: N6-Phe-cAMP  
 Orange: N6-Bn-cAMP  
 Blau: 8-Cl-cAMP  
 Hellgrün: 2-Cl-cAMP  
 Rosa: N6-Bnz-cAMP

## 6 Schlussfolgerungen

Das Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob die untersuchten cAMP-Derivate eine Auswirkung auf den Strom durch den HCN2-Kanal haben und wenn dies der Fall sein sollte, wie sie diesen Strom beeinflussen. Folgende Erkenntnisse konnten aus den *Patch-Clamp*-Experimenten gewonnen werden:

1) 2-Cl-cAMP, 8-Cl-cAMP, N6-Phe-cAMP, N6-Bn-cAMP und N6-Bnz-cAMP führen zu einer Aktivierung des HCN2-Kanals.

2) Die Interaktionen der chemisch modifizierten cAMP-Analoga mit dem HCN2-Kanal unterscheiden sich untereinander und von den Wirkungen des nativen cAMP's.

2.1) Der maximale Strom durch den HCN2-Kanal wird durch alle Liganden erreicht. Dafür sind jedoch unterschiedlich hohe Konzentrationen notwendig.

2.2) Die halbmaximale Aktivierung  $EC_{50}$  und damit die Affinität zum Kanal unterscheidet sich zwischen den untersuchten Liganden.

2.3) Die Aktivierungskinetik des HCN2-Kanals unterscheidet sich bei den gemessenen Liganden nach Normierung der Konzentration nicht.

3) Bei der Untersuchung cAMP-vermittelter Proteinkinase A Signalwege sollten potentielle Kreuzreaktionen mit HCN-Kanälen berücksichtigt werden.

4) Bei der Anwendung der in dieser Arbeit untersuchten cAMP-Analoga ist mit Kreuzreaktionen durch die Aktivierung von HCN-Kanälen zu rechnen.

5) Eine Steigerung der Proteinselektivität der cAMP-Analoga durch weitere chemische Modifikationen ist empfehlenswert.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akimoto M, Zhang Z, Boulton S, Selvaratnam R, VanSchouwen B, Gloyd M, Accili EA, Lange OF, Melacini G. 2014. A mechanism for the auto-inhibition of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel opening and its relief by cAMP. *J Biol Chem*, 289 (32):22205-22220.
- Ally S, Tortora G, Clair T, Grieco D, Merlo G, Katsaros D, OGREID D, Doskeland SO, Jahnsen T, Cho-Chung YS. 1988. Selective modulation of protein kinase isozymes by the site-selective analog 8-chloroadenosine 3',5'-cyclic monophosphate provides a biological means for control of human colon cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (17):6319-6322.
- Banales JM, Masyuk TV, Gradilone SA, Masyuk AI, Medina JF, LaRusso NF. 2009. The cAMP effectors Epac and protein kinase a (PKA) are involved in the hepatic cystogenesis of an animal model of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hepatology*, 49 (1):160-174.
- Benarroch EE. 2013. HCN channels: function and clinical implications. *Neurology*, 80 (3):304-310.
- Berman HM, Ten Eyck LF, Goodsell DS, Haste NM, Kornev A, Taylor SS. 2005. The cAMP binding domain: an ancient signaling module. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (1):45-50.
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, Zong X. 2009. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev*, 89 (3):847-885.
- Biel M, Zong X, Distler M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, Flockerzi V, Hofmann F. 1994. Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (9):3505-3509.
- Biel M, Altenhofen W, Hullin R, Ludwig J, Freichel M, Flockerzi V, Dascal N, Kaupp UB, Hofmann F. 1993. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from rabbit aorta. *FEBS Lett*, 329 (1-2):134-138.
- BIOLOG. LSI Bremen 2018. Produktkatalog.
- Biskup C, Kusch J, Schulz E, Nache V, Schwede F, Lehmann F, Hagen V, Benndorf K. 2007. Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels. *Nature*, 446 (7134):440-443.
- Bos JL. 2006. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci*, 31 (12):680-686.
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. 1979. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature*, 280 (5719):235-236.
- Chen J, Mitcheson JS, Lin M, Sanguinetti MC. 2000. Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J Biol Chem*, 275 (46):36465-36471.
- Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. 2001. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol*, 117 (5):491-504.
- Chepurny OG, Bertinetti D, Diskar M, Leech CA, Afshari P, Tsalkova T, Cheng X, Schwede F, Genieser HG, Herberg FW, Holz GG. 2013. Stimulation of proglucagon gene expression by human GPR119 in enteroendocrine L-cell line GLUTag. *Mol Endocrinol*, 27 (8):1267-1282.

- Cho-Chung YS. 1990. Role of cyclic AMP receptor proteins in growth, differentiation, and suppression of malignancy: new approaches to therapy. *Cancer Res*, 50 (22):7093-7100.
- Cho-Chung YS, Clair T. 1993. The regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase as a target for chemotherapy of cancer and other cellular dysfunctional-related diseases. *Pharmacol Ther*, 60 (2):265-288.
- Cobbs WH, Barkdoll AE, 3rd, Pugh EN, Jr. 1985. Cyclic GMP increases photocurrent and light sensitivity of retinal cones. *Nature*, 317 (6032):64-66.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, 396 (6710):474-477.
- Dicitore A, Grassi ES, Caraglia M, Borghi MO, Gaudenzi G, Hofland LJ, Persani L, Vitale G. 2016. The cAMP analogs have potent anti-proliferative effects on medullary thyroid cancer cell lines. *Endocrine*, 51 (1):101-112.
- DiFrancesco D. 1981. A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol*, 314:377-393.
- DiFrancesco D. 1993. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol*, 55:455-472.
- DiFrancesco D. 1999. Dual allosteric modulation of pacemaker (f) channels by cAMP and voltage in rabbit SA node. *J Physiol*, 515 ( Pt 2):367-376.
- DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. 1986. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol*, 377:61-88.
- DiFrancesco JC, DiFrancesco D. 2015. Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases. *Front Cell Neurosci*, 6:174.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*, 280 (5360):69-77.
- Edman A, Gestrelus S, Grampp W. 1987. Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly adapting lobster stretch receptor neurone. *J Physiol*, 384:671-690.
- Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL. 1985. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature*, 313 (6000):310-313.
- Filadi R, Pozzan T. 2015. Generation and functions of second messengers microdomains. *Cell Calcium*, 58 (4):405-414.
- Flynn GE, Black KD, Islas LD, Sankaran B, Zagotta WN. 2007. Structure and rearrangements in the carboxy-terminal region of SpH channels. *Structure*, 15 (6):671-682.
- Grassi ES, Dicitore A, Negri I, Borghi MO, Vitale G, Persani L. 2017. 8-Cl-cAMP and PKA I-selective cAMP analogs effectively inhibit undifferentiated thyroid cancer cell growth. *Endocrine*, 56 (2):388-398.
- Guillemin MC, Raffoux E, Vitoux D, Kogan S, Soilihi H, Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Janin A, Daniel MT, Gourmel B, Degos L, Dombret H, Lanotte M, De Thé H. 2002. In vivo activation of cAMP signaling induces growth arrest and differentiation in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med*, 196 (10):1373-1380.
- Habib SL, Mohan S, Liang S, Li B, Yadav M. 2015. Novel mechanism of transcriptional regulation of cell matrix protein through CREB. *Cell Cycle*, 14 (16):2598-2608.

- Ishii TM, Nakashima N, Ohmori H. 2007. Tryptophan-scanning mutagenesis in the S1 domain of mammalian HCN channel reveals residues critical for voltage-gated activation. *J Physiol*, 579 (Pt 2):291-301.
- Jager R, Russwurm C, Schwede F, Genieser HG, Koesling D, Russwurm M. 2012. Activation of PDE10 and PDE11 phosphodiesterases. *J Biol Chem*, 287 (2):1210-1219.
- James ZM, Zagotta WN. 2018. Structural insights into the mechanisms of CNBD channel function. *J Gen Physiol*, 150 (2):225-244.
- Katsaros D, Tortora G, Tagliaferri P, Clair T, Ally S, Neckers L, Robins RK, Cho-Chung YS. 1987. Site-selective cyclic AMP analogs provide a new approach in the control of cancer cell growth. *FEBS Lett*, 223 (1):97-103.
- Kaupp UB, Seifert R. 2001. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol*, 63:235-257.
- Kloss S, Srivastava R, Mulsch A. 2004. Down-regulation of soluble guanylyl cyclase expression by cyclic AMP is mediated by mRNA-stabilizing protein HuR. *Mol Pharmacol*, 65 (6):1440-1451.
- Kolesnikov SS, Rebrik TI, Zhainazarov AB, Tavartkiladze GA, Kalamkarov GR. 1991. A cyclic-AMP-gated conductance in cochlear hair cells. *FEBS Lett*, 290 (1-2):167-170.
- Lange-Carter CA, Vuillequez JJ, Malkinson AM. 1993. 8-Chloroadenosine mediates 8-chloro-cyclic AMP-induced down-regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase in normal and neoplastic mouse lung epithelial cells by a cyclic AMP-independent mechanism. *Cancer Res*, 53 (2):393-400.
- Lee CH, MacKinnon R. 2017. Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel. *Cell*, 168 (1-2):111-120.e111.
- Liman ER, Tytgat J, Hess P. 1992. Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron*, 9 (5):861-871.
- Löffler G, Petrides P, Heinrich P. 2006. *Biochemie&Pathobiochemie*. 8. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Lu D, Aroonsakool N, Yokoyama U, Patel HH, Insel PA. 2013. Increase in cellular cyclic AMP concentrations reverses the profibrogenic phenotype of cardiac myofibroblasts: a novel therapeutic approach for cardiac fibrosis. *Mol Pharmacol*, 84 (6):787-793.
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, 393 (6685):587-591.
- Lyashchenko AK, Tibbs GR. 2008. Ion binding in the open HCN pacemaker channel pore: fast mechanisms to shape "slow" channels. *J Gen Physiol*, 131 (3):227-243.
- Mayer ML, Westbrook GL. 1983. A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J Physiol*, 340:19-45.
- McCormick K, Baillie GS. 2014. Compartmentalisation of second messenger signalling pathways. *Curr Opin Genet Dev*, 27:20-25.
- Miller JP. 1981. Cyclic AMP derivatives as tools for mapping cyclic AMP binding sites of cyclic AMP-dependent protein kinases I and II. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 14:335-344.
- Misaka T, Kusakabe Y, Emori Y, Gono T, Arai S, Abe K. 1997. Taste buds have a cyclic nucleotide-activated channel, CNGgust. *J Biol Chem*, 272 (36):22623-22629.

- Mistrik P, Mader R, Michalakakis S, Weidinger M, Pfeifer A, Biel M. 2005. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem*, 280 (29):27056-27061.
- Moll D, Prinz A, Gesellchen F, Drewianka S, Zimmermann B, Herberg FW. 2006. Biomolecular interaction analysis in functional proteomics. *J Neural Transm (Vienna)*, 113 (8):1015-1032.
- Moller S, Alfieri A, Bertinetti D, Aquila M, Schwede F, Lolicato M, Rehmann H, Moroni A, Herberg FW. 2014. Cyclic nucleotide mapping of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels. *ACS Chem Biol*, 9 (5):1128-1137.
- Morad M, Zhang XH. 2017. Mechanisms of spontaneous pacing: sinoatrial nodal cells, neonatal cardiomyocytes, and human stem cell derived cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol*:1-8.
- Nakamura T, Gold GH. 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*, 325 (6103):442-444.
- Ogreid D, Dorskland SO. 1982. Activation of protein kinase isoenzymes under near physiological conditions. Evidence that both types (A and B) of cAMP binding sites are involved in the activation of protein kinase by cAMP and 8-N3-cAMP. *FEBS Lett*, 150 (1):161-166.
- Ogreid D, Ekanger R, Suva RH, Miller JP, Dorskland SO. 1989. Comparison of the two classes of binding sites (A and B) of type I and type II cyclic-AMP-dependent protein kinases by using cyclic nucleotide analogs. *Eur J Biochem*, 181 (1):19-31.
- Ogreid D, Ekanger R, Suva RH, Miller JP, Sturm P, Corbin JD, Dorskland SO. 1985. Activation of protein kinase isozymes by cyclic nucleotide analogs used singly or in combination. Principles for optimizing the isozyme specificity of analog combinations. *Eur J Biochem*, 150 (1):219-227.
- Otte M, Schweinitz A, Bonus M, Enke U, Schumann C, Gohlke H, Benndorf K. 2018. Hydrophobic alkyl chains substituted to the 8-position of cyclic nucleotides enhance activation of CNG and HCN channels by an intricate enthalpy - entropy compensation. *Sci Rep*, 8 (1):14960.
- Pepe S, Tortora G, Noguchi PD, Marti GE, Washington GC, Cho-Chung YS. 1991. Effects of 8-chloroadenosine 3',5'-monophosphate and N6-benzyl-cyclic adenosine 5'-monophosphate on cell cycle kinetics of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res*, 51 (23 Pt 1):6263-6267.
- Pian P, Bucci A, Robinson RB, Siegelbaum SA. 2006. Regulation of Gating and Rundown of HCN Hyperpolarization-activated Channels by Exogenous and Endogenous PIP. *The Journal of General Physiology*, 128 (5):593-604.
- Poppe H, Rybalkin SD, Rehmann H, Hinds TR, Tang XB, Christensen AE, Schwede F, Genieser HG, Bos JL, Dorskland SO, Beavo JA, Butt E. 2008. Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat Methods*, 5 (4):277-278.
- Postea O, Biel M. 2011. Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 10 (12):903-914.
- Qiu W, Lee B, Lancaster M, Xu W, Leung S, Guggino SE. 2000. Cyclic nucleotide-gated cation channels mediate sodium and calcium influx in rat colon. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278 (2):C336-343.
- Rehmann H, Schwede F, Dorskland SO, Wittinghofer A, Bos JL. 2003. Ligand-mediated activation of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem*, 278 (40):38548-38556.

- Rohlf C, Clair T, Cho-Chung YS. 1993. 8-Cl-cAMP induces truncation and down-regulation of the RI alpha subunit and up-regulation of the RII beta subunit of cAMP-dependent protein kinase leading to type II holoenzyme-dependent growth inhibition and differentiation of HL-60 leukemia cells. *J Biol Chem*, 268 (8):5774-5782.
- Sartiani L, Romanelli MN, Mugelli A, Cerbai E. 2015. Updates on HCN Channels in the Heart: Function, Dysfunction and Pharmacology. *Curr Drug Targets*, 16 (8):868-876.
- Sartiani L, Mannaioni G, Masi A, Novella Romanelli M, Cerbai E. 2017. The Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels: from Biophysics to Pharmacology of a Unique Family of Ion Channels. *Pharmacol Rev*, 69 (4):354-395.
- Schmidt M, Dekker FJ, Maarsingh H. 2013. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol Rev*, 65 (2):670-709.
- Scott SP, Shea PW, Dryer SE. 2007. Mapping ligand interactions with the hyperpolarization activated cyclic nucleotide modulated (HCN) ion channel binding domain using a soluble construct. *Biochemistry*, 46 (33):9417-9431.
- Stieber J, Stockl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F. 2005. Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem*, 280 (41):34635-34643.
- Sunkara MR, Schwabe T, Ehrlich G, Kusch J, Benndorf K. 2018. All four subunits of HCN2 channels contribute to the activation gating in an additive but intricate manner. *J Gen Physiol*, 150 (9):1261-1271.
- Tagliaferri P, Katsaros D, Clair T, Ally S, Tortora G, Neckers L, Rubalcava B, Parandoosh Z, Chang YA, Revankar GR, et al. 1988. Synergistic inhibition of growth of breast and colon human cancer cell lines by site-selective cyclic AMP analogues. *Cancer Res*, 48 (6):1642-1650.
- Thiel G, Al Sarraj J, Stefano L. 2005. cAMP response element binding protein (CREB) activates transcription via two distinct genetic elements of the human glucose-6-phosphatase gene. *BMC Mol Biol*, 6:2.
- Thon S. 2012. Die Wechselbeziehung zwischen Aktivierung und Ligandenbindung in HCN2-Schrittmacherkanälen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Tibbs GR, Posson DJ, Goldstein PA. 2016. Voltage-Gated Ion Channels in the PNS: Novel Therapies for Neuropathic Pain? *Trends Pharmacol Sci*, 37 (7):522-542.
- Varnum MD, Black KD, Zagotta WN. 1995. Molecular mechanism for ligand discrimination of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*, 15 (3):619-625.
- Verkerk AO, Wilders R. 2015. Pacemaker activity of the human sinoatrial node: an update on the effects of mutations in HCN4 on the hyperpolarization-activated current. *Int J Mol Sci*, 16 (2):3071-3094.
- Wahl-Schott C, Biel M. 2009. HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci*, 66 (3):470-494.
- Wahl-Schott C, Fenske S, Biel M. 2014. HCN channels: new roles in sinoatrial node function. *Curr Opin Pharmacol*, 15:83-90.
- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR. 2001. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*, 411 (6839):805-810.
- Wang J, Chen S, Siegelbaum SA. 2001. Regulation of Hyperpolarization-Activated Hcn Channel Gating and Camp Modulation Due to Interactions of CooH Terminus and Core Transmembrane Regions. *J Gen Physiol*, 118 (3):237-250.



- Wei JY, Roy DS, Leconte L, Barnstable CJ. 1998. Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 56 (1):37-64.
- Weissinger EM, Oettrich K, Evans C, Genieser HG, Schwede F, Dangers M, Dammann E, Kolb HJ, Mischak H, Ganser A, Kolch W. 2004. Activation of protein kinase A (PKA) by 8-Cl-cAMP as a novel approach for antileukaemic therapy. *Br J Cancer*, 91 (1):186-192.
- Weyand I, Godde M, Frings S, Weiner J, Muller F, Altenhofen W, Hatt H, Kaupp UB. 1994. Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature*, 368 (6474):859-863.
- Wollmuth LP, Hille B. 1992. Ionic selectivity of Ih channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J Gen Physiol*, 100 (5):749-765.
- Xu W, Leung S, Wright J, Guggino SE. 1999. Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in airway epithelial cells. *J Membr Biol*, 171 (2):117-126.
- Yagura TS, Sigman CC, Sturm PA, Reist EJ, Johnson HL, Miller JP. 1980. Mapping cyclic AMP binding sites on type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinases using 2-substituted derivatives of cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 92 (2):463-467.
- Yao X, Leung PS, Kwan HY, Wong TP, Fong MW. 1999. Rod-type cyclic nucleotide-gated cation channel is expressed in vascular endothelium and vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 41 (1):282-290.
- Yellen G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419 (6902):35-42.
- Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA. 2005. Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacological Reviews*, 57 (4):387-395.
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E. 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*, 425 (6954):200-205.
- Zhou L, Siegelbaum SA. 2007. Gating of HCN channels by cyclic nucleotides: residue contacts that underlie ligand binding, selectivity, and efficacy. *Structure*, 15 (6):655-670.
- Zorn M, Fladmark KE, OGREID D, Jastorff B, Doskeland SO, Dostmann WR. 1995. Ala335 is essential for high-affinity cAMP-binding of both sites A and B of cAMP-dependent protein kinase type I. *FEBS Lett*, 362 (3):291-294.

## **8 Anhang**

### **8.1 Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde entfernt.

## 8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Jana Kusch,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

## 8.3 Danksagung

Ich freue mich, an dieser Stelle allen herzlich danken zu können, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Klaus Benndorf für die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten,

allen Mitarbeitern des Instituts für Herz-Kreislauf-Physiologie für die herzliche Aufnahme und tatkräftige Unterstützung,

Dr. Jana Kusch für ihre Freundlichkeit, ihre fachliche Expertise und die intensive Betreuung, die es mir ermöglichte, diese experimentelle Dissertation parallel zum Medizinstudium zu schaffen,

Karin Schoknecht und Prof. Dr. Thomas Zimmer für die Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten,

Karin Schoknecht, Sandra Bernhardt, Andrea Kolchmeier und Claudia Ranke für ihre technische Assistenz,

meiner Familie, die mich motivierte,

meiner Freundin Sophie, für ihr Verständnis, durch das ich mich guten Gewissens dieser zeitaufwändigen Arbeit widmen konnte und ihren Ehrgeiz, der mich anspornte.